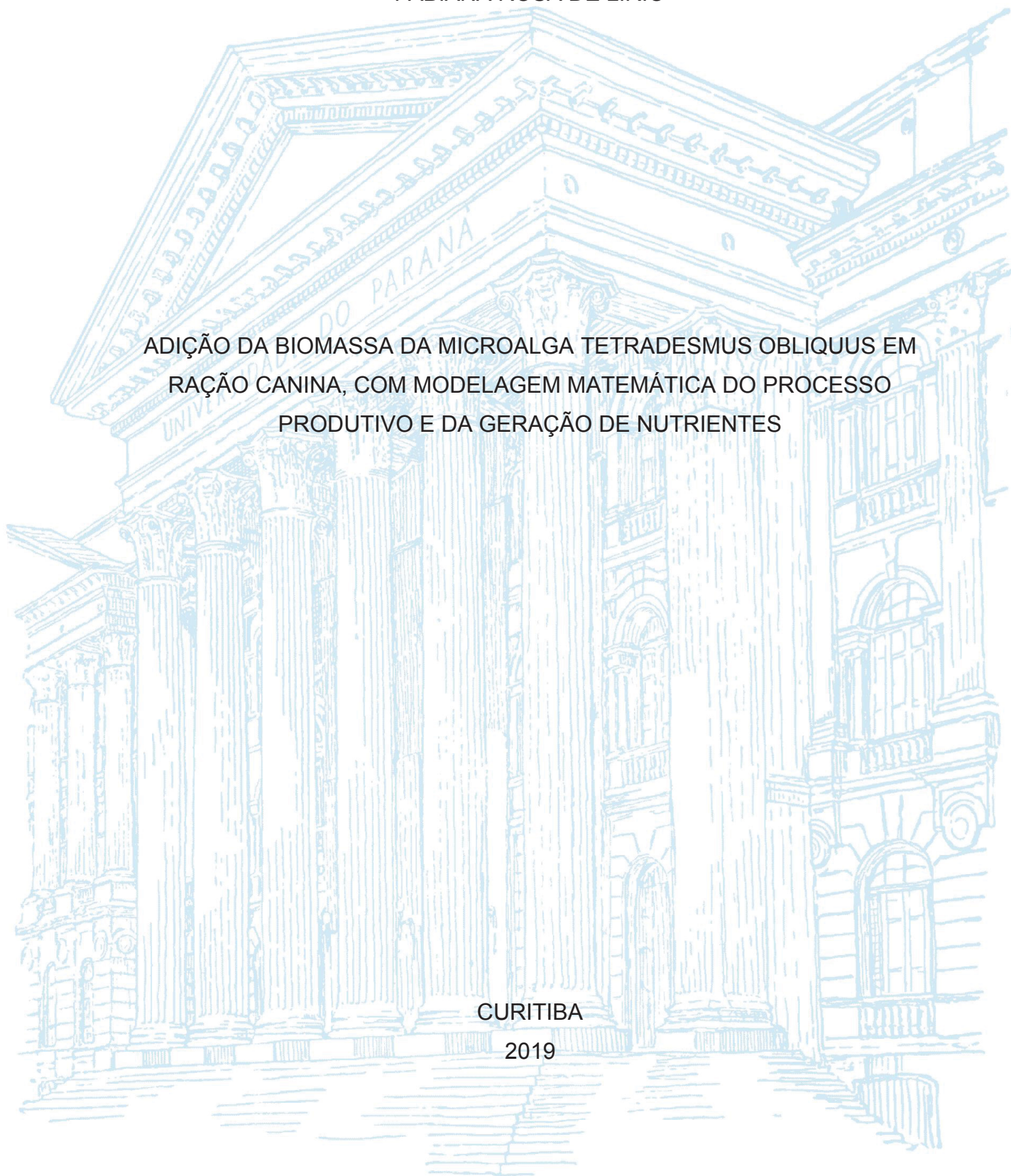


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FABIANA ROSA DE LIRIO

ADIÇÃO DA BIOMASSA DA MICROALGA TETRADESMUS OBLIQUUS EM
RAÇÃO CANINA, COM MODELAGEM MATEMÁTICA DO PROCESSO
PRODUTIVO E DA GERAÇÃO DE NUTRIENTES

CURITIBA
2019



FABIANA ROSA DE LIRIO

ADIÇÃO DA BIOMASSA DA MICROALGA TETRADESMUS OBLIQUUS EM
RAÇÃO CANINA, COM MODELAGEM MATEMÁTICA DO PROCESSO
PRODUTIVO E DA GERAÇÃO DE NUTRIENTES

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Eng. Mecânica, Setor de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Eng. Mecânica. Área: Fenômenos de Transporte e Engenharia Térmica.

Orientador: Prof. Dr. José Viriato Coelho Vargas

Coorientadora: Profa. Dra. Ananda Portella Félix

Coorientador: Dr. Wellington Balmant

CURITIBA

2019

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

- L768a Lirio, Fabiana Rosa de
Adição da biomassa da microalga *Tetrademus obliquus* em ração canina, com modelagem matemática do processo produtivo e da geração de nutrientes [recurso eletrônico] / Fabiana Rosa de Lirio. – Curitiba, 2019.
- Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências e Tecnologia, Programa de Pós - Graduação em Engenharia Mecânica, 2019.
- Orientador: José Viriato Coelho Vargas. Coorientadora: Ananda Portella Félix. Coorientador: Wellington Balmant.
1. Ácidos graxos essenciais. 2. Ácidos graxos Ômega-3. 3. Biomassa. 4. Algas como ração. 5. Animais de estimação – Indústria. I. Universidade Federal do Paraná. II. Vargas, José Viriato Coelho. III. Félix, Ananda Portella. IV. Balmant, Wellington. V. Título.

CDD: 579.8

Bibliotecária: Vanusa Maciel CRB- 9/1928



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA
MECÂNICA - 40001016040P5

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA MECÂNICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **FABIANA ROSA DE LÍRIO** intitulada: **ADIÇÃO DA BIOMASSA DA MICROALGA TETRADESMUS OBLIQUUS EM RAÇÃO CANINA, COM MODELAGEM MATEMÁTICA DO PROCESSO PRODUTIVO E DA GERAÇÃO DE NUTRIENTES**, sob orientação do Prof. Dr. JOSE VIRIATO COELHO VARGAS, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 29 de Novembro de 2019.


JOSE VIRIATO COELHO VARGAS
Presidente da Banca Examinadora


LUIZ ALBERTO DE OLIVEIRA ROCHA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


ANDRE BELLIN MARIANO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


LUCIANO KIYOSHI ARAKI
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


JOSÉ ALBERTO REIS PARISE
Avaliador Externo (PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO DE JANEIRO)

Dedico esta conquista aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

Agradeço ao NPDEAS pelo fornecimento das informações e matéria prima para a pesquisa. Ao LENUCAN pela disponibilidade da estrutura e orientações necessárias para o desenvolvimento do trabalho em campo.

Agradeço também aos laboratórios parceiros da UFPR: Laboratório de Nutrição Animal, Laboratório do Hospital Veterinário, Laboratório de Química, Laboratório de Hidrologia e Saneamento. Ao Laboratório da Faculdade Estadual de Maringá.

Agradecimento especial aos orientadores Profa. Dra. Ananda Portella Félix e Prof. Dr. José Viriato Coelho Vargas. A equipe do setor de Zootecnia e do próprio LENUCAN e ao apoio também do setor de veterinária da UFPR que forneceu informações importantes para o entendimento e coleta de amostras. Aos cães participantes da pesquisa.

Enfim agradecimento a todos que direta ou indiretamente contribuíram com esta pesquisa.

“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo,
participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade. ”

MARIE CURIE, 1867-1934

RESUMO

A biomassa da microalga *Tetradismus obliquus*, espécie cultivada no laboratório do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento em Energia Autossustentável (NPDEAS), situado na UFPR, foi caracterizada quanto as suas propriedades nutricionais para posterior uso como suplemento em uma ração para cães. Sendo assim, no primeiro momento foram realizados ensaios para identificação e quantificação de proteína bruta, extrato etéreo, resíduo mineral, fibra bruta, energia bruta, cálcio, fósforo, sódio e potássio, bem como foi identificada a presença de ácido graxo essencial pertencente ao grupo ômega 3. Neste estudo foram investigados os possíveis benefícios destes elementos para o enriquecimento nutricional na dieta de cães utilizando para este fim um grupo de 16 cães adultos, saudáveis, vacinados e desverminados, da raça Beagle, pertencentes ao Laboratório de Estudos em Nutrição Canina (LENUCAN) do setor de Zootecnia da UFPR. Os animais foram distribuídos em dois grupos de 8 cães, um grupo controle e o outro submetido ao tratamento com dosagem de 5% de biomassa de microalga sobre quantidade de ração (kg de biomassa seca/kg de ração). A pesquisa foi complementada com a análise termoeconômica do processo produtivo da ração, em escala industrial e considerando a dosagem da biomassa da microalga no misturador de grãos, com objetivo de estimar os custos com energia e exergia. A elaboração de um modelo matemático em regime transiente foi desenvolvida como uma proposta de ferramenta para gerenciamento da produção de lipídeos, proteínas e carboidratos, que são elementos de interesse nutricional na composição das dietas. Os resultados obtidos mostraram que a biomassa da microalga *Tetradismus obliquus* pode ser utilizada como suplemento alimentar na ração canina, uma vez que não foram detectados sinais de toxicidade e, mesmo em sua forma natural, ou seja, sem uso de palatilizantes, mostrou que a fração ingerida da ração tratamento foi 14% maior, bem como o número de primeira visita ao pote foi 60% maior quando ofertada a ração com adição da biomassa. A ração tratamento (5% de biomassa de microalga) obteve valor de energia metabolizável 11% maior, o que pode significar bom aproveitamento dos nutrientes pelo organismo dos cães. A concentração de fibras totais 17% mais elevada, bem como concentração 6% menor de resíduos minerais nas fezes do grupo tratamento pode ter contribuído para obtenção de fezes mais firmes e melhor formadas. Nos cães machos, alimentados com a ração tratamento, foi observado redução em torno de 20% nos níveis de colesterol do sangue, além de ter sido mantido o peso corporal.

Palavras-chave: *Tetradismus obliquus*. Ácido graxo essencial. Análise termoeconômica. Modelagem matemática.

ABSTRACT

The biomass of the microalgae *Tetradesmus obliquus*, a species cultivated in the laboratory of the Sustainable Energy Research and Development Center (NPDEAS), located at UFPR, was characterized as its nutritional properties for later use as supplement in a dog food. Thus, in the first moment, tests were performed to identify and quantify crude protein, ether extract, mineral residue, crude fiber, crude energy, calcium, phosphorus, sodium and potassium, as well as the presence of essential fatty acid belonging to the group omega 3. In this study we investigated the possible benefits of these elements for nutritional enrichment in the diet of dogs using for this purpose a group of 16 healthy, vaccinated and wormless adult dogs of the Beagle breed, belonging to the Canine Nutrition Studies Laboratory (LENUCAN) from the UFPR Zootechnics sector. The animals were divided into two groups of 8 dogs, one control group and the other submitted to treatment with 5% microalgae biomass dosage on feed quantity (kg dry biomass / kg feed). The research was complemented with a thermoeconomic analysis of the production process of the ration, on an industrial scale and considering the microalgae biomass dosage in the grain mixer, aiming to estimate the energy and exergy costs. The elaboration of a transient mathematical model was developed as a tool proposal for managing the production of lipids, proteins and carbohydrates, which are elements of nutritional interest in the elaboration of diets. The results showed that the biomass of *Tetradesmus obliquus* microalgae can be used as a dietary supplement in canine feed, since it showed no signs of toxicity and, even in its natural form, ie, without the use of palatabilizers, showed that the ingested fraction of the treatment diet was 14% higher, and the number of first visits to the pot was 60% higher when offered the diet with the addition of biomass. The treatment ration (5% of microalgae biomass) obtained a metabolizable energy value 11% higher, which can mean a good use of nutrients by the dog's organism. The 17% higher total fiber concentration, as well as the 6% lower concentration of mineral residues in the stools of treatment group, may have contributed to obtain firmer and better formed stools. In male dogs, fed with the treatment diet, a reduction of around 20% in blood cholesterol levels was observed, in addition to maintaining body weight.

Keywords: *Tetradesmus obliquus*. Essential fatty acid. Thermoeconomic analysis. Mathematical modeling.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - FOTOBIOREACTORES COMPACTOS CONSTRUÍDOS NA UFPR	17
FIGURA 2 - DIAGRAMA: UNIDADE PILOTO DE PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL	18
FIGURA 3 - DIAGRAMA: ÁREA DE ARMAZENAGEM E TRANSPORTE DE GRÃOS	19
FIGURA 4 - DIAGRAMA: ÁREA DE PROCESSAMENTO DE GRÃOS	19
FIGURA 5 - SISTEMAS ABERTOS DE CULTIVO DE MICROALGAS	22
FIGURA 6 - BIOMASSA ÚMIDA APÓS CENTRIFUGAÇÃO.....	23
FIGURA 7 - FLUXOGRAMA COM AS ETAPAS DA PESQUISA	37
FIGURA 8 - FORNO MUFLA UFPR.....	40
FIGURA 9 - FOTOCOLORÍMETRO	45
FIGURA 10 - PREPARAÇÃO AMOSTRA, DIGESTÃO E DESTILAÇÃO.....	48
FIGURA 11 - APARELHO EXTRATOR DE FIBRA	50
FIGURA 12 - VASO DE PRESSÃO (BOMBA CALORIMÉTRICA) E CALORÍMETRO	55
FIGURA 13 - FILTRAÇÃO, MEIO DE CULTURA E PLACA TRAY	60
FIGURA 14 - SELAGEM NO MOLDE E LEITURA UV	61
FIGURA 15 - PROCESSO DE AUTOCLAVE.....	61
FIGURA 16 - PLACAS INOCULADAS APÓS INCUBAÇÃO	62
FIGURA 17 - FLUXO PROC. INDUSTRIAL DE PRODUÇÃO DA RAÇÃO	65
FIGURA 18 - REPRES. ESQUEMÁTICA DOS FLUXOS CELULARES.....	70
FIGURA 19 - FLUXO DE GÁS CARBÔNICO NO MEIO DE CULTIVO.....	73
FIGURA 20 - ARRANJO EXPERIMENTAL DO CULTIVO EM LABORATÓRIO	75
FIGURA 21 - PESAGEM DA BIOMASSA E ADIÇÃO NA RAÇÃO.....	77
FIGURA 22 - APRESENTAÇÃO DO CANIL E ALOJAMENTO (BAIAS).....	79
FIGURA 23 - ARMAZENAGEM, REFRIGERAÇÃO E SECAGEM DAS FEZES	80
FIGURA 24 - QUALIDADE APARENTE DAS FEZES: GRUPO CONTROLE	95
FIGURA 25 - QUALIDADE APARENTE DAS FEZES: GRUPO TRATAMENTO	95

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – PROTEÍNA BRUTA.....	83
GRÁFICO 2 – LIPÍDEOS TOTAIS.....	84
GRÁFICO 3 – FIBRA FDA	84
GRÁFICO 4 – FIBRA FDN	85
GRÁFICO 5 – ENERGIA BRUTA.....	85
GRÁFICO 6 – EXTRATO ETÉREO	86
GRÁFICO 7 – CÁLCIO.....	86
GRÁFICO 8 – FÓSFORO	87
GRÁFICO 9 – POTÁSSIO.....	87
GRÁFICO 10 – SÓDIO	88
GRÁFICO 11 – PERFIL LIPÍDICO: SEM AUTOCLAVE.....	89
GRÁFICO 12 – PERFIL LIPÍDICO: APÓS AUTOCLAVE.....	90
GRÁFICO 13 – COMPARATIVO ENTRE ÀS PROPRIEDADES DAS DIETAS	92
GRÁFICO 14 – COMPARATIVO ENTRE ÀS PROPRIEDADES DAS FEZES.....	94
GRÁFICO 15 – GRUPO CONTROLE: PESO INICIAL E FINAL	97
GRÁFICO 16 – GRUPO TRATAMENTO: PESO INICIAL E FINAL	98
GRÁFICO 17 – GRUPO CONTROLE: INÍCIO E FIM DO EXPERIMENTO	99
GRÁFICO 18 – GRUPO TRATAMENTO: INÍCIO E FIM DO EXPERIMENTO.....	100
GRÁFICO 19 – GRUPO TRATAMENTO: CÃES MACHOS.....	101
GRÁFICO 20 – TRIGLICÉRIDES: GRUPO TRATAMENTO	102
GRÁFICO 21 – TRIGLICÉRIDES: GRUPO CONTROLE.....	102
GRÁFICO 22 – PARTICIPAÇÃO DOS EQUIPAMENTOS NO CUSTO EXERGÉTICO	105
GRÁFICO 23 – RESULTADO DA MODELAGEM DA BIOMASSA SECA.....	106
GRÁFICO 24 – RESULTADO: MODELAGEM DA PORCENTAGEM DE LIPÍDEOS	106
GRÁFICO 25 – RESULTADO: MODELAGEM DA PORCENTAGEM DE CARBOIDRATO	107
GRÁFICO 26 – RESULTADO: MODELAGEM DA PORCENTAGEM DE PROTEÍNA	107

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – RESUMO DA LITERATURA CONSULTADA	27
QUADRO 2 – VARIÁVEIS E RESULTADOS DA LITERATURA CONSULTADA.....	31
QUADRO 3 – ANÁLISE EXERGOECONÔMICA NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS	33
QUADRO 4 – LISTAGEM DOS DESAFIOS E TEMAS FUTUROS PROPOSTOS ...	35

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – METODOLOGIAS DE ENSAIO	38
TABELA 2 – NORMAS MICROBIOLÓGICAS PARA RAÇÕES	63
TABELA 3 – FATOR DE POTÊNCIA E MASSA ESPECÍFICA DE ALGUNS PRODUTOS.....	67
TABELA 4 – FATORES DE CORREÇÃO - POTÊNCIA DO TRANSP. HELICOIDAL.	68
TABELA 5 – PROPRIEDADES DO MATERIAL DE FABRICAÇÃO DO SILO	69
TABELA 6 – PARÂMETROS DE MODELAGEM	76
TABELA 7 – CARACTERÍSTICAS NUTRICIONAIS DA RAÇÃO.....	77
TABELA 8 – PROPRIEDADES DA BIOMASSA.....	83
TABELA 9 – PERFIL LIPIDICO: SEM AUTOCLAVE	88
TABELA 10 – PERFIL LIPIDICO: APÓS AUTOCLAVE	90
TABELA 11 – RESULTADOS DE ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	91
TABELA 12 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS DIETAS	92
TABELA 13 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FEZES.....	93
TABELA 14 – COEF. DE DIGESTIBILIDADE APARENTE E ENERGIA METABOLIZÁVEL.....	96
TABELA 15 – RESULTADOS QUANTO À PREFERÊNCIA ALIMENTAR.....	96
TABELA 16 – PESO CORPORAL ANTES E APÓS EXPERIMENTO	97
TABELA 17 – COLESTEROL ANTES E APÓS EXPERIMENTO	99
TABELA 18 – COLESTEROL GRUPO TRATAMENTO: FÊMEAS x MACHOS.....	100
TABELA 19 – TRIGLICÉRIDES: TRATAMENTO x CONTROLE	101
TABELA 20 – ALT/TGP: GRUPO TRATAMENTO	103
TABELA 21 – CUSTOS EXERGÉTICOS POR EQUIPAMENTO.....	103

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ABINPET	- Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação
ALA	- Ácido alfa linolênico
AAFCO	- Associação Americana de Controle da Alimentação Animal
ALT/TGP	- Alanina Aminotransferase
Ca	- Cálcio
CBAA	- Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal
CEUA	- Comitê de Ética no Uso de Animais
DHA	- Ácido decosahexaenóico
EPA	- Ácido eicosapentaenoico
EE	- Extrato etéreo
ENN	- Extrativos não nitrogenados
FB	- Fibra bruta
FDA	- Fibra detergente ácido
FDN	- Fibra detergente neutro
IAL	- Instituto Adolfo Lutz
LA	- Ácido linoleico
LCHBio	- Laboratório de Catálise Heterogênea e Biodiesel
LENUCAN	- Laboratório de Estudos da Nutrição Canina
NPDEAS	- Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável
PIB	- Produto Interno Bruto
PVC	- Policloreto de vinil
PUFA	- Ácidos graxos poli-insaturados
PB	- Proteína bruta
P	- Fósforo
RM	- Resíduo mineral
UFPR	- Universidade Federal do Paraná

LISTA DE SÍMBOLOS

CO_2^{in}	concentração de entrada do gás carbônico, mg L ⁻¹
$C_{CO_2}^*$	concentração de gás carbônico diluída, mg L ⁻¹
C_{CO_2}	concentração de gás carbônico no ar de entrada, mg L ⁻¹
$\frac{d_{CO_2}}{dt}$	taxa de consumo de gás carbônico, mg L ⁻¹ dia ⁻¹
$\frac{d_{C_6H_{12}O_6}}{dt}$	taxa de consumo de glicose, mg L ⁻¹ dia ⁻¹
$\frac{d_{NH_3}}{dt}$	taxa de consumo de amônia, mg L ⁻¹ dia ⁻¹
H_{CO_2}	constante de Henry para o gás carbônico em função da temperatura, kPa
kg mol ⁻¹	
I	fator de incidência da luz, Lux
K _{sl}	coeficiente de saturação da luz, μmol m ⁻² s ⁻¹
K _{il}	coeficiente de inibição da luz, μmol m ⁻² s ⁻¹
K _{sCO2}	coeficiente de saturação da concentração de CO ₂ , μmol m ⁻² s ⁻¹
K _{iCO2}	coeficiente de inibição da concentração de CO ₂ , μmol m ⁻² s ⁻¹
K _{sLip}	constante de saturação da concentração de lipídeos, μmol m ⁻² s ⁻¹
K _{sCarb}	constante de saturação da concentração de carboidratos, μmol m ⁻² s ⁻¹
K _{sProt}	constante de saturação da concentração de proteínas, μmol m ⁻² s ⁻¹
K _{sNH₃}	constante de saturação da amônia, μmol m ⁻² s ⁻¹
Kla _{CO2}	coeficiente de transferência de massa, adimensional
P _{CO2} ⁰	pressão parcial do gás carbônico, atm
q _{Lipmax}	taxa máxima de acumulação da concentração de lipídeos, g g ⁻¹
q _{Carbmax}	taxa máxima de acumulação da concentração de carboidratos, g g ⁻¹

$q_{Protmax}$	taxa máxima de acumulação da concentração de proteínas, g g ⁻¹
X	concentração de biomassa, mg L ⁻¹
y_{CO_2}	massa molecular do gás carbônico, g
$y_{C_6H_{12}O_6}$	massa molecular da glicose, g
y_{Lip}	massa molar de lipídeos, g
y_{Carb}	massa molar de carboidratos, g
y_{Prot}	massa molar de proteínas, g
y_{NH_3}	massa molar da amônia, g
y_X	massa molar da biomassa, g

Letras gregas

μ_{max}	taxa específica máxima de crescimento, dia ⁻¹
μ_{Foto}	taxa específica de crescimento, dia ⁻¹
μ_{Lip}	taxa de acumulação lipídica, g g ⁻¹
μ_{Carb}	taxa de acumulação de carboidratos, g g ⁻¹
μ_{Prot}	taxa de acumulação de proteínas, g g ⁻¹

Subscritos

Carb	carboidratos
Carbmax	máxima acumulação de carboidratos
Foto	fotossíntese
il	inibição da luz
Lip	lipídeos
Lipmax	máxima acumulação de lipídeos
max	máxima

Prot	proteínas
Protmax	máxima acumulação de proteínas
s	saturação
sl	saturação da luz
[.]	concentração mássica, mg L ⁻¹
$\frac{d[.]}{dt}$	taxa de produção, mg L ⁻¹ dia ⁻¹

Sobrescrito

in	entrada
*	diluído
0	parcial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 JUSTIFICATIVA	20
1.2 ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 MICROALGAS	21
2.2 BIOMASSA DE MICROALGAS.....	22
2.2.1 Biomassa de microalgas e alimentação	23
2.2.2 Biomassa de microalgas na alimentação de animais de estimação.....	27
2.2.3 Análise termoeconômica – processo de produção da ração	31
2.2.4 Modelagem – produção de nutrientes	34
2.3 DESAFIOS	35
2.4 OBJETIVOS	36
2.4.1 Objetivos geral	36
2.4.2 Objetivos específicos.....	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA DA MICROALGA	39
3.1.1 Determinação de cinzas (resíduo mineral)	39
3.1.2 Determinação cálcio - oxidimetria	41
3.1.3 Determinação fósforo	43
3.1.4 Determinação sódio e potássio	45
3.1.5 Determinação da proteína bruta.....	46
3.1.6 Determinação da fibra bruta	48
3.1.7 Determinação da fibra detergente ácido (F.D.A)	50
3.1.8 Determinação da fibra detergente neutro (F.D.N)	51
3.1.9 Determinação de extrato etéreo	53
3.1.10 Determinação de energia bruta ou poder calorífico.....	54
3.1.11 Determinação da clorofila a,b e carotenóides totais	55
3.1.12 Determinação dos lipídeos totais	56
3.1.13 Determinação do perfil lipídico	58
3.2 TRATAMENTO MICROBIOLÓGICO.....	59
3.3 CARACTERIZAÇÃO DA RAÇÃO SUPLEMENTADA	63
3.4 ANÁLISE TERMoeconômica	63

3.5 ELABORAÇÃO DO MODELO MATEMÁTICO	70
3.6 MEIO DE CULTIVO – CRESCIMENTO	74
3.7 OBTENÇÃO DOS DADOS EXPERIMENTAIS	75
3.8 VALIDAÇÃO DO MODELO	75
3.9 ENSAIO COM OS CÃES.....	76
3.10 COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS	80
3.10.1 Análise das amostras biológicas	80
3.11 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS	81
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA DA MICROALGA	82
4.1.1 Determinação do perfil lipídico	88
4.2 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....	91
4.3 CARACTERIZAÇÃO DA RAÇÃO.....	91
4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS FEZES	93
4.5 ANÁLISE DA DIGESTIBILIDADE.....	95
4.6 ANÁLISE DA PALATABILIDADE	96
4.7 ANÁLISE DO PESO CORPORAL E AMOSTRAS DE SANGUE	97
4.7.1 Comparativo do peso corporal antes e após experimento	97
4.7.2 Resultados das amostras de sangue	98
4.7.2.1 Análise do colesterol.....	98
4.7.2.2 Análise dos triglicérides	101
4.7.2.3 Análise do ALT/TGP (alanina aminotransferase)	103
4.8 ANÁLISE TERMOECONÔMICA	103
4.9 RESULTADOS DA MODELAGEM.....	105
5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES	108
5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	110
REFERÊNCIAS.....	111

1 INTRODUÇÃO

A expansão do mercado de rações para animais de estimação no Brasil vem crescendo a cada ano, tanto em volume quanto em qualidade nutricional. Segundo dados fornecidos pela Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação ABINPET (2017, não paginado), a indústria pet brasileira foi responsável por um faturamento de mais de R\$ 18,9 bilhões em 2016, crescimento de 4,9% sobre 2015 e terceiro lugar absoluto no mercado mundial, atrás apenas dos Estados Unidos e Reino Unido. As exportações movimentaram US\$ FOB 236,3 milhões em 2016, contra cerca de US\$ FOB 6,7 milhões de importações. O Brasil é o quarto país no ranking de população de animais de estimação no mundo, com 132,4 milhões de pets. Esse contingente movimenta um setor que, em 2016, chegou a ocupar 0,37% do PIB nacional, número superior àqueles dos componentes elétricos e eletrônicos e automação industrial. As vendas de “*Pet Food*” continuam sendo a maior fonte de receita, ocupando 67,5% do faturamento do ano passado, seguidas por *Pet Serv*, com 16,7%. *Pet Care* representou 8,1% e *Pet Vet*, 7,8%.

Neste contexto o desenvolvimento de formulações cada vez mais aprimoradas é um atrativo para os consumidores donos de pets, principalmente no que diz respeito ao valor nutricional, propriedades voltadas para prevenção de doenças, tais como obesidade, diabetes, doenças cardíacas, entre outras são comercializadas com preços diferenciados, uma vez que possuem elementos de maior valor agregado em sua composição. O uso de fontes alternativas e naturais de minerais, ácidos graxos poliinsaturados, proteínas, vem despertando o interesse dos produtores de ração para pet, um exemplo são as rações das marcas Guabi Natural e fórmula Natural super *premium*, que contêm em sua formulação a adição de maçãs e chá verde (como fonte de polifenóis), bem como farinha de algas marinhas (fonte de cálcio). No Brasil a empresa Alltech comercializa, para uso em rações pet, um produto em pó denominado SP-1, fabricado a base de uma mistura de biomassa demicroalgas e leveduras, as microalgas são provindas do cultivo heterotrófico. O produto é ofertado como um suplemento com alto nível de proteínas e ômega 3, ALLTECH (2017, não paginado).

Portanto, o uso da biomassa de microalgas na formulação ou adicionada à ração para pets é uma aplicação que vem sendo estudada, uma vez que, segundo Santos (2016, p. 18-19), estes microrganismos possuem alta eficiência fotossintética,

capacidade de duplicar sua biomassa em menos de uma semana, não necessitam do uso de áreas cultiváveis para o seu desenvolvimento e, sobretudo possuem alto teor de lipídeos, carboidratos e proteínas em determinadas espécies, tornando-se potenciais substitutos de produtos como óleo de peixe, fontes protéicas e vegetais. Os peixes marinhos tais como salmão, atum, cavala, sardinha, são algumas fontes de EPA (ácido eicosapentaenóico) e DHA (ácido docosahexaenóico), produtos comercializados principalmente em forma de cápsulas, porém, a sustentabilidade das unidades populacionais globais e os efeitos ambientais da aquicultura, sugerem que novas fontes sejam encontradas para atender a uma crescente demanda mundial, (ELKIN *et al.*, 2016).

Outro fator interessante é a possibilidade de aliar produção de biomassa à produção de biodiesel, tratamento de efluentes e emissões, tornando as microalgas ainda mais atrativas para o uso em diversas aplicações. Com relação a este panorama, o Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável (NPDEAS) da UFPR possui um sistema de produção de biomassa de microalgas composto por cinco fotobiorreatores compactos, conforme apresentado na FIGURA 1, os quais foram desenvolvidos para produção em larga escala, com uma concepção inovadora e patente internacional, (VARGAS, 2013, p. 17).

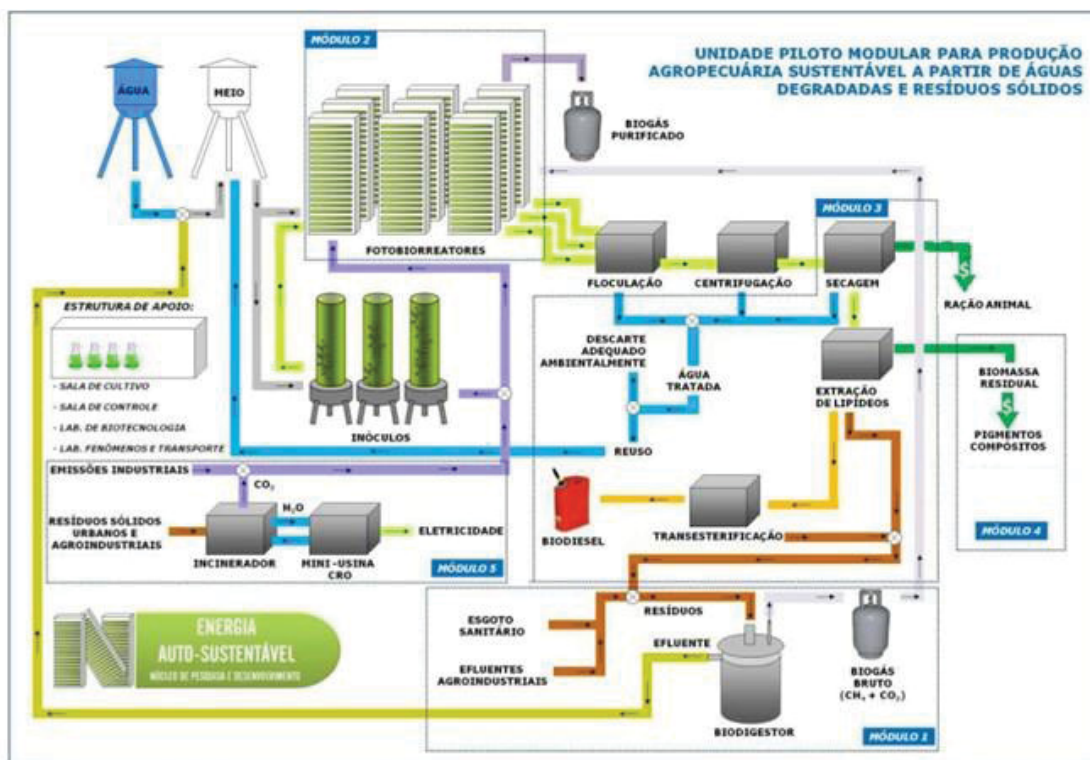
FIGURA 1 - FOTOBIORREACTORES COMPACTOS CONSTRUÍDOS NA UFPR



FONTE: NPDEAS (2017).

A planta do NPDEAS tem como principal objetivo fechar o ciclo de distribuição de energia representado na FIGURA 2. Desta forma, neste estudo decidiu-se pela aplicação da biomassa da microalga *Tetrademus obliquus*, espécie atualmente cultivada com o *know how* desenvolvido pela equipe de pesquisadores e alunos vinculados ao NPDEAS, em uma ração comercial para cães. Vale salientar que as operações de produção de biomassa são realizadas pelo grupo desde 2008, ou seja, são mais de 10 anos de experiência atuando com o cultivo autotrófico em larga escala (BLOG NPDEAS, 2017, não paginado).

FIGURA 2 - DIAGRAMA: UNIDADE PILOTO DE PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL

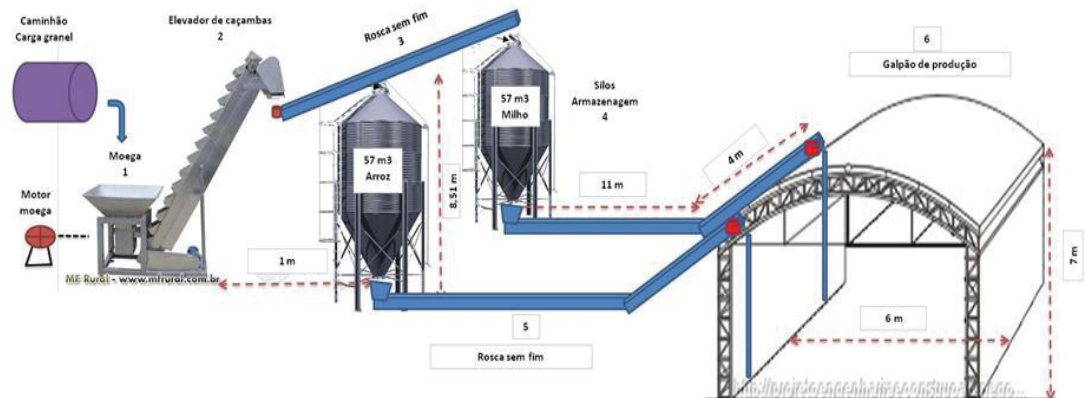


FONTE: Modificado de VARGAS (2013, p. 32).

A pesquisa, portanto, utilizou como matéria prima a biomassa de microalga produzida no NPDEAS, a qual foi dosada sobre uma ração comercial barata (sem presença de aditivos que possam conflitar os resultados a serem observados). A segunda etapa do estudo engloba a análise termoeconômica de uma planta de produção de ração animal, com base num diagrama esquemático do processo onde a biomassa foi dosada direto no misturador de grãos. Para facilitar a análise exergética, a planta foi dividida em uma área externa de recepção de grãos e outra área interna de processamento dos grãos e peletização, conforme apresentado nas

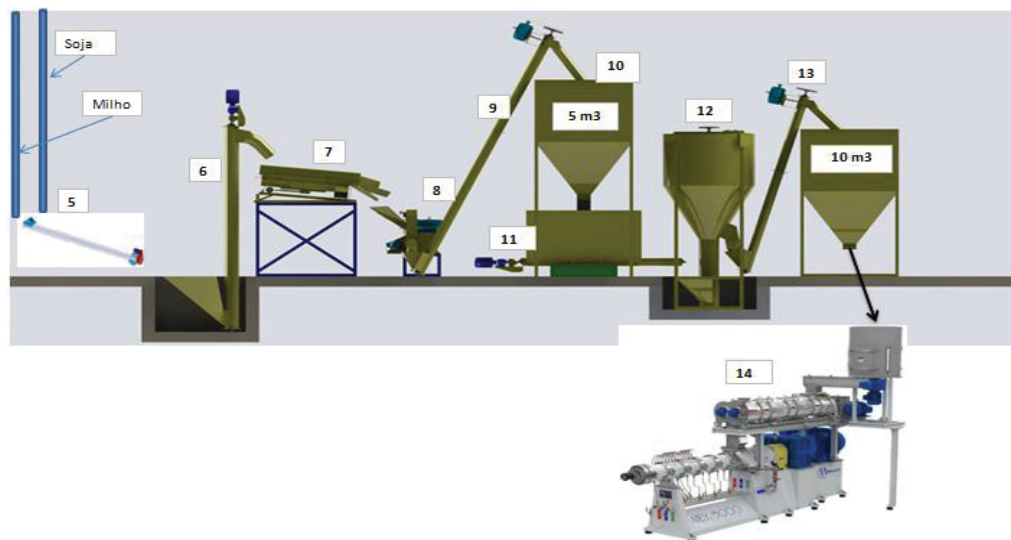
FIGURAS 3 e 4. A elaboração de um modelo matemático em regime transiente foi desenvolvida como uma proposta para gerenciamento da produção de nutrientes a partir do cultivo da microalga, visando melhor desempenho na obtenção de lipídeos, proteínas e carboidratos.

FIGURA 3 - DIAGRAMA: ÁREA DE ARMAZENAGEM E TRANSPORTE DE GRÃOS



Fonte: a autora (2016)

FIGURA 4 - DIAGRAMA: ÁREA DE PROCESSAMENTO DE GRÃOS



Fonte: Nutrimex (2017)

Na FIGURA 4 os números são referentes aos seguintes equipamentos: 5 – calha tubular móvel; 6 – elevador de canecas; 7 – mesa de limpeza de grãos; 8 – moinho martelo; 9 – rosca transportadora; 10 – silo de armazenagem intermediário;

11 – caçamba de pesagem; 12 – misturador de grãos; 13 – silo pulmão e 14 – extrusora e peletizadora.

1.1 JUSTIFICATIVA

Apesar de alguns produtos, contendo em suas formulações a adição de farinhas de algas ou microalgas, estarem sendo comercializados no segmento nutricional, tanto para animais quanto para humanos, o uso da biomassa de microalgas nos produtos destinados aos animais de estimação, do ponto de vista científico, ainda conta com poucos trabalhos publicados quando se trata da dieta para cães e gatos, principalmente quanto a aplicação da microalga *Tetrademus obliquus*. Sendo assim, o estudo se justifica como fonte de informação nutricional sobre a possibilidade de uso da biomassa desta espécie de microalga na ração para cães e os possíveis benefícios para a saúde animal. Além disto, busca promover conhecimento quanto à viabilidade da ração suplementada em termos exergéticos aliado a modelagem dos parâmetros de interesse nutricional presentes na biomassa (lipídeos, carboidratos e proteínas).

1.2 ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO

O capítulo 1 fornece uma introdução ao tema e explica sobre os conceitos fundamentais nos quais a pesquisa foi baseada. O capítulo 2 apresenta a revisão da literatura fornecendo informações do estado da arte atual sobre o tema, ou seja, o que está sendo estudado e pesquisado, bem como apresenta os desafios sobre os pontos ainda não explorados. O capítulo 3 informa quanto às metodologias e matérias que foram utilizadas no desenvolvimento do trabalho de pesquisa, ou seja, aponta como os objetivos específicos foram elaborados e realizados. O capítulo 4 apresenta os resultados obtidos na pesquisa, resultantes das aplicações das metodologias e métodos utilizados. Por fim, o capítulo 5 apresenta as considerações finais e recomendações para trabalhos futuros.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão da literatura foi a base para o desenvolvimento do estudo e contém informações importantes sobre o que está sendo realizado e como estão sendo desenvolvidas as pesquisas na área de interesse. Desta forma, possibilita uma visão geral sobre o que pode ser complementado ou mesmo sobre o que ainda não foi observado e que pode promover resultados importantes.

Portanto, esta revisão foi dividida em sub temas buscando facilitar o entendimento do assunto e ao mesmo tempo apresentar, com clareza, os pontos importantes das pesquisas realizadas para a coletânea de artigos encontrados neste levantamento. Primeiro foram apresentados conceitos básicos sobre a biologia das microalgas e diferentes modelos de cultivo. Em seguida foram citadas algumas aplicações referentes ao uso da biomassa de microalgas, principalmente como fonte nutricional na alimentação humana e animal.

2.1 MICROALGAS

As microalgas são microrganismos fotossintetizantes de grande importância, uma vez que sintetizam biocompostos de alto valor agregado, tais como lipídeos, pigmentos, proteínas, entre outros. As condições de cultivo, síntese e metabolismo, podem influenciar na produção de ácidos graxos, portanto a composição bioquímica da biomassa de microalgas é determinada pela espécie algal, fatores como intensidade da luz, pH, temperatura, nutrientes e concentração de CO₂. O cultivo de microalgas é realizado de forma contínua ou em batelada, em curto tempo, requerendo pequenas áreas (não competindo por terras cultiváveis), bem como o uso do CO₂ como fonte de carbono promove a redução deste no meio ambiente, FERREIRA *et al.* (2013).

Conforme citado por Taher (2013, p. 37- 38), as microalgas podem ser produzidas em meio autotrófico ou heterotrófico, sendo os sistemas classificados como abertos ou fechados. Alguns exemplos de sistemas abertos são as lagoas tipo pista e tanques, sendo os fotobiorreatores horizontais ou verticais classificados como sistemas fechados, os quais são tidos como de melhor eficiência em relação ao risco de contaminação, uma vez que protegem o cultivo do contato com o meio ambiente. A FIGURA 5 apresenta alguns modelos de sistema de cultivo aberto.

Santos (2016, p. 21) destaca que dentre as algas mais estudadas podem-se citar as dos gêneros *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Spirulina* e *Scenedesmus*. Sendo que algumas espécies desta última recentemente foram transferidas para o gênero *Tetrademus*, inclusive a espécie utilizada nesse estudo, *Tetrademus obliquus* (anteriormente denominada *Scenedesmus obliquus*).

O sistema de produção do NPDEAS utiliza meios variados de cultivo produzidos em fotobiorreatores compactos, formados por tubos transparentes de PVC onde a aeração é realizada por meio de compressores industriais e a circulação do cultivo é feita por bombas centrífugas, TAHER (2013).

FIGURA 5 - SISTEMAS ABERTOS DE CULTIVO DE MICROALGAS



FONTE: Bioenergia microalgas (2017).

2.2 BIOMASSA DE MICROALGAS

O processo de obtenção da biomassa envolve as etapas de floculação, centrifugação, filtração, secagem e moagem. Ainda segundo Taher (2013, p. 37- 38), o custo de produção da biomassa de microalgas ainda é alto quando relacionado a obtenção do biodiesel, portanto existem vários estudos voltados para a redução destes custos operacionais. Sendo assim, um dos fatores que contribuem para o encarecimento do processo é o meio de cultivo. O autor cita o exemplo do meio de cultivo CHU, que gera o custo de R\$ 32,02 (base 2013) para produção de 1000 litros de cultura, além dos custos de energia envolvidos na secagem, por exemplo.

Desta forma, como alternativa para redução de custos e ainda mantendo o conceito de sustentabilidade, o NPDEAS utiliza o dejetos suíno bioprocessado (provindo de biodigestores) na composição do meio de cultivo, o qual é um resíduo extremamente poluente quando não devidamente destinado ou tratado. Porém, para o posterior uso da biomassa como fonte de nutrientes na ração para animais foi necessária a inclusão da etapa de esterilização que envolve o uso de autoclave na eliminação de possíveis contaminações microbiológicas. A FIGURA 6 mostra a retirada da biomassa nas etapas de centrifugação e preparação para secagem.

FIGURA 6 - BIOMASSA ÚMIDA APÓS CENTRIFUGAÇÃO



FONTE: NPDEAS (2011)

2.2.1 Biomassa de microalgas e alimentação

O uso de biomassa de microalgas, referente a algumas espécies liberadas para comercialização, quando na dieta humana dá-se principalmente por meio da preparação de encapsulados ricos em proteínas e vitaminas ou da mistura de pós de alga em alimentos industrializados como massas, biscoitos, doces e bebidas, algumas espécies vem sendo cultivadas há mais de 35 anos para emprego na forma de tabletas, pílulas e líquido, funcionando fundamentalmente como suplemento alimentar ou como corante natural de alimentos, (VARGAS, 2013, p. 27).

Um exemplo deste tipo de aplicação foi realizado no trabalho de Barros (2010) que utilizou a biomassa da microalga *Spirulina platensis* na composição de um tipo de macarrão para alimentação humana. A biomassa da microalga em questão é atualmente utilizada como suplemento alimentar devido ao seu elevado valor protéico, presença de aminoácidos essenciais, vitaminas, sais minerais, ácidos graxos poliinsaturados e outros compostos de interesse nutricional. As dosagens utilizadas na preparação da massa foram de 5, 10 e 15% e o produto foi avaliado por meio de ensaio sensorial com participação de 58 provadores não treinados. Os resultados obtidos mostraram que o aumento da concentração de biomassa na formulação resultou em aumento do valor nutricional e em relação ao ensaio sensorial, o maior percentual (93,10%) de avaliações positivas foi referente à dosagem de 10% da biomassa de *Spirulina platensis*.

Assim como na alimentação humana, o uso da biomassa de microalgas na alimentação animal vem sendo melhor explorado em trabalhos científicos, principalmente com aplicações na aquicultura, avicultura industrial (frangos de corte e poedeiras), suinocultura, dentre outras. O uso da biomassa de microalgas como aditivo nutricional na ração de frangos, por exemplo, tem o enriquecimento nutricional da carne e ovos como uma das principais linhas de pesquisa. Em geral a biomassa seca de microalgas contém níveis de proteína entre 30 a 55%, lipídeos totais em torno de 13 a 33%, com consideráveis quantidades de ácidos graxos poliinsaturados, elevada concentração de vitaminas e pigmentos tais como clorofila e carotenóides (Vizcaíno et al., 2014).

Apesar deste potencial das microalgas para aplicação no setor de nutrição estar sendo reconhecido, o sucesso comercial foi possível com apenas algumas poucas espécies, tais como *Spirulina* e *Chlorella*, ocupando nichos de mercado, TIBBETTS et al. (2015).

Dentro deste contexto, o trabalho de Balen et al (2015) forneceu dados importantes para esta pesquisa devido ao fato do autor ter utilizado a biomassa da microalga *Scenedesmus obliquus*, produzida no NPDEAS, para alimentação de peixes. Na pesquisa foram utilizados 120 peixes da espécie *Rhamdia quelen*, os quais foram alimentados com dietas contendo 1, 2 e 3% de biomassa residual na composição da ração. Os resultados obtidos indicaram que a biomassa residual da microalga pode ser adicionada as dietas sem afetar significativamente o desempenho do crescimento e taxas de sobrevivência.

Vizcaíno et al. (2014) estudaram os efeitos da farinha de biomassa da microalga *Scenedesmus almeriensis* quando incorporada na dieta destinada a alimentação de peixes. O experimento foi realizado no período de 45 dias de acompanhamento, com grupos de 15 peixes/tanque, sendo um total de 15 tanques. As dietas foram testadas em triplicata com diferentes níveis de inclusão (0%, 12%, 20%, 25% e 39%). O objetivo do estudo foi avaliar o crescimento, a composição corporal e a funcionalidade intestinal dos peixes, portanto os resultados indicaram que a microalga *S. almeriensis* não causou efeitos negativos no crescimento dos peixes ou na eficiência de utilização de nutrientes, portanto não houve diferença significativa de crescimento e ganho de peso quando comparado ao grupo controle. As amostras biológicas não indicaram alterações significativas nos níveis de proteínas, lipídeos totais e cinzas quando comparado ao grupo controle, porém foi verificado um aumento no nível de atividade enzimática, bem como da superfície absorptiva, principalmente na dosagem de 20%.

A adição de fontes concentradas em ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) na alimentação de frangos de corte pode levar ainda ao aumento destes na composição da carne, o que consequentemente contribui para o enriquecimento na dieta humana. Segundo Elkin et al. (2016), numerosos estudos epidemiológicos e ensaios clínicos randomizados forneceram provas convincentes de que a ingestão elevada de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa são benéficos no contexto da diminuição da morbidade e mortalidade por doenças cardiovasculares, podendo ainda melhorar as condições inflamatórias, como a artrite reumatóide, a função cognitiva e acuidade visual de crianças prematuras.

Sendo assim, Elkin et al (2016) estudaram a influência da alimentação de frangos de corte quando enriquecida com óleo de soja adicionada de ácido estearidônico (18:4n-3), comparado ao óleo de soja convencional. Foi verificada principalmente a deposição de ácidos graxos de cadeia longa na carne. Para a pesquisa foram utilizados 60 frangos fêmeas de um ano de idade, acomodados na proporção de 10 frangos/gaiola e alimentados com dieta padrão (a base de milho e soja) até os 21 dias de acompanhamento, após este período os frangos foram remanejados na proporção de 4 frangos/gaiola e continuaram a receber a alimentação padrão por mais 7 dias. No vigésimo oitavo dia, 40 frangos com peso uniforme foram separados, sendo 8 deles eutanasiados para retirada de tecidos (peito, fígado e músculo), os outros 32 foram separados, 16 aves/gaiola, para a alimentação com e

sem suplementação (dosagem de 50g/Kg para as duas dietas). Os resultados mostraram que não houve diferença significativa com relação ao ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar, bem como ambas as dietas possibilitaram igual eficiência quanto ao depósito de n-3 PUFAS nos tecidos do peito, coxas e músculos.

Lemahieu et al. (2013) utilizaram a biomassa de microalgas para o enriquecimento de ovos das galinhas poedeiras, porém neste caso os autores estudaram 4 tipos diferentes de microalgas para avaliar o desempenho com relação à concentração de ômega-3. As espécies de microalgas utilizadas no experimento foram a *Phaeodactylum tricornutum*, *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana* e *Chlorella fusca*, cujas biomassas apresentam diferentes quantidades de ômega-3. O total de 72 galinhas poedeiras, alojadas na proporção de 2 galinhas/gaiola (8 galinhas/dieta, sendo administradas 8 dosagens e 1 controle sem suplementação) foram alimentadas com ração suplementada, sendo 14 dias de adaptação com dieta padrão e 28 dias de suplementação (total de 42 dias) e mantidas em uma sala climatizada. Cada uma das 4 biomassas testadas foi adicionada em 2 dosagens totalizando as 8 dietas (com níveis extra de 125 e 250 mg em ALA+EPA+DHA/100 g de ração, correspondente a 2,5% a 8,6% de biomassa de microalgas). Os resultados alcançados mostraram que todas as 4 biomassas testadas deram origem a níveis aumentados de n-3 LC-PUFA na gema dos ovos; sendo que os maiores valores foram observados na suplementação com a *Phaeodactylum* e *Isochrysis* (principalmente EPA e DHA) e o menor enriquecimento foi obtido com a *Chlorella* provavelmente devido à ineficaz conversão de ALA em DHA. A concentração de carotenoides na gema dos ovos também foi aumentada por suplementação de *Phaeodactylum*, *Isochrysis* e *Nannochloropsis*, portanto deve-se tomar cuidado com o desvio de cor da gema do ovo, pois pode diminuir a aceitabilidade dos consumidores.

Saeid et al. (2013), por meio do processo de biossorção, adicionou o mineral Cu(II) à biomassa da microalga *Spirulina* sp para utilizar como suplemento na alimentação de suínos e verificar suas propriedades nutricionais. Foram então utilizados 24 leitões divididos em dois grupos sendo um grupo controle, o qual foi alimentado com suplementos inorgânicos tradicionais de microelementos, enquanto o grupo experimental foi alimentado com a dieta contendo biomassa de *Spirulina* com Cu(II). O experimento foi realizado pelo período total de 87 dias, sendo dividido conforme as fases de desenvolvimento: inicial (26 dias), crescimento (31 dias) e final

(30 dias). A dosagem de biomassa suplementada com minerais foi diferente para cada fase, sendo 4% correspondente na fase inicial, 3% na fase de crescimento e 2,5% para a fase final. Os resultados mostraram que a absorção aparente foi 30% maior no grupo experimental, porém não foi possível detectar qualquer efeito nos resultados de ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar. Verificou-se que a concentração de cobre nas fezes foi 60% menor no grupo experimental, portanto a biomassa de *Spirulina* sp enriquecida com Cu(II) por biossorção é uma alternativa promissora aos sais inorgânicos atualmente utilizados como fonte de microelementos nutricionalmente importantes. O QUADRO 1 apresenta um resumo da literatura consultada.

QUADRO 1 – RESUMO DA LITERATURA CONSULTADA

Aditivo	Tipo	Grupo	Idade	Dosagem	Resultado	Ref.
Microalga	<i>Spirulina platensis</i>	58 humanos	adultos	5, 10 e 15%	Maior valor nutricional. Dosag. 10% aprovada no ensaio sensorial.	Barros <i>et al.</i> (2010)
Microalga	<i>Scenedesmus obliquus</i>	120 peixes	Peso 1,54 g	1, 2 e 3%	Aprovação para uso nas dietas sem alteração no crescimento.	Balenet <i>al.</i> (2015)
Microalga	<i>Scenedesmus almeriensis</i>	225peixes	28 dias	12, 20, 25 e 39%	Não alterou o crescimento e peso corporal. Aumento ativ enzimática (a 20%).	Vizcainoet <i>al.</i> (2014)
Óleo + SDA	Ômega 3 (PUFA)	32 frangos	28 dias	50 g/kg	Desempenho semelhante na disposição de ômega 3 na carne.	Elkinet <i>al.</i> (2016)
Microalga	P. tricornutum, N. oculata, I. galbana e C. fusca	72 poedeiras	29 semanas	2,5 a 8,6%	Aumento a conc PUFA nos ovos. Aumento conc. Carotenóide na gema	Lemahieuet <i>al.</i> (2013)
Microalga	<i>Spirulina</i> sp	24leitões	Filhotes	2,5; 3 e 4%	Aumento da absorção em 30%. Redução cobre nas fezes	Saeidet <i>al.</i> (2013)

FONTE: a autora (2016)

2.2.2 Biomassa de microalgas na alimentação de animais de estimação

A pesquisa bibliográfica realizada mostrou que existem poucos estudos sobre o uso de biomassa de microalgas no segmento de alimentação para animais de estimação (cães e gatos), salientando que, para a biomassa da microalga *Tetrademus obliquus*, espécie utilizada neste trabalho de pesquisa, não foi encontrada nenhuma obra dentre a coletânea consultada. Sendo assim, dos trabalhos visualizados, apenas um artigo apresentou o uso de biomassa de microalga incorporada à dieta de cães com intuito de observar os efeitos sobre as características

cognitivas na fase senescente, outro artigo apenas menciona a possibilidade de uso de algas marinhas, certos tipos de plantas e insetos, como fonte alternativa de proteína, na alimentação para animais de estimação. A revisão da bibliografia possibilitou ainda verificar a existência de maior número de pesquisas relacionadas à adição de ácidos graxos essenciais (ômega 3) na alimentação de gatos e cachorros obtendo resultados interessantes em termos de melhorias em quadros cardíacos, inflamações da pele, retina, entre outros.

Hadeley *et al.* (2017) recentemente realizaram um estudo sobre o uso do óleo da microalga *Schizochytrium sp.* como fonte de ácido docosahexaenoico (DHA) na dieta de um modelo canino senescente. O objetivo dos autores foi avaliar melhorias na aprendizagem de discriminação de formas associada ao processo visual. A dosagem de biomassa seca utilizada na dieta foi de 0,4%, ministrada na ração para um grupo de 26 cães da raça Beagle com idade entre 8,6 a 11,1 anos, sendo 10 fêmeas. Os animais tiveram 42 dias de adaptação e durante os próximos 124 dias foram submetidos a uma bateria de testes cognitivos. Os resultados obtidos mostraram que são necessárias investigações adicionais para confirmar as observações relacionadas ao desempenho nas avaliações cognitivas da aprendizagem espacial, memória e processamento visual em animais pré-senescentes e envelhecidos. Porém, em geral os autores concluíram que as observações foram consistentes com a associação entre o consumo de uma dieta fortificada com biomassa rica em DHA e o suporte da função cerebral saudável.

McCusker *et al.* (2014) analisaram 20 espécies de plantas, 18 tipos de algas marinhas e 5 espécies de insetos para uso na alimentação de cães e gatos como fontes alternativas, sustentáveis e naturais, de nitrogênio e aminoácidos, incluindo a taurina. As amostras foram liofilizadas, hidrolisadas e filtradas para análise de aminoácidos e o nitrogênio foi determinado, de modo indireto, por meio dos cálculos na análise de proteína bruta. Os resultados indicaram que as maiores concentrações de taurina foram encontradas nas amostras de insetos e algumas espécies de macroalgas, principalmente as algas vermelhas, com índices acima dos requisitos especificados para cães e gatos. Desta forma, os autores concluíram com base nestes resultados preliminares, que insetos e algumas espécies de algas marinhas podem ser alternativas práticas às proteínas tradicionais e às fontes de taurina suplementares em alimentos para animais de estimação. Porém os autores não realizaram ensaios com os animais.

Um estudo realizado anteriormente por Neto *et al.* (2010) analisou o uso da farinha de algas marinhas (*Lithothamnium calcareum*) como suplemento mineral na cicatrização óssea de auto enxerto cortical em cães. No experimento foram utilizados 10 cães, adultos, machos, sem raça definida, com peso entre 10 e 15 kg. Os animais, após procedimento cirúrgico para enxertia no membro pélvico homolateral, foram separados em dois grupos com 5 cães cada e um grupo recebeu suplementação diária à base de farinhas de algas marinhas, na dosagem de 5 g diluídas em 10 ml de água, durante o período de 30 dias consecutivos e o outro grupo serviu como controle. Desta forma, após avaliações clínicas foi concluído que a suplementação à base de algas marinhas *Lithothamnium calcareum* contribuiu para um melhor desempenho cicatricial nos animais tratados.

Conforme mencionado, outra linha de pesquisa interessante para o estudo em questão é a elaboração de dietas para animais de estimação contendo adição de ácidos graxos essenciais. O tema está indiretamente relacionado ao uso alternativo da biomassa de microalgas, uma vez que a mesma contém alguns tipos destes ácidos graxos em sua composição. Portanto, Araujo *et al.* (2012) administrou a um grupo de cães, por via oral, cápsulas comerciais de ômega 3 (497 mg de ácido docosahexaenóico - DHA e 780 mg de ácido eicosapentaenoico - EPA). Para o estudo foram utilizados 20 cães, sem raça definida, saudáveis, sendo 10 machos e 10 fêmeas e o objetivo da pesquisa foi analisar a concentração sérica de colesterol e triglicerídeos nas amostras de sangue coletadas. Os cães receberam duas cápsulas de ômega 3 por dia, durante 30 dias. Os resultados indicaram que a concentração sérica de colesterol apresentou redução significativa após a suplementação em ambos os sexos. Porém em relação à concentração sérica de triglicerídeos houve redução apenas nas fêmeas, antes e após suplementação respectivamente.

Bauer (2008) fez uma revisão da literatura sobre o efeito dos ácidos graxos essenciais no metabolismo de cães e gatos. O autor informa que cães e gatos não são tão suscetíveis a doenças arteriais coronárias quanto os seres humanos e podem, portanto, consumir maior quantidade de gorduras saturadas. A razão para isto é o fato de possuírem maior concentração de HDL (colesterol bom) em seu organismo. Os ácidos graxos essenciais do tipo ômega 3 são considerados como gorduras funcionais que podem ser convertidos em ácidos graxos de cadeia longa (EPA e DHA), que são poderosos mediadores das funções celulares. Portanto, o consumo de ácido graxo alfa linolênico (ALA) para os gatos deve ser cuidadosamente dosado, pois elevadas

concentrações podem ser contra indicadas. Nos cães a mistura de ALA (dosagem de 3% de linhaça sobre ração) com LA (ácido linoleico) resultou em baixa conversão, porém com rápido acúmulo de EPA (após 4 dias de experimento) e DHA (após 28 dias de experimento), sendo observada melhora nos escores de pelos e pele, além de modificação da resposta cutânea inflamatória.

Park *et al.* (2011) desenvolveram um estudo sobre a inclusão de óleo de peixe e óleo de linhaça na dieta de gatos com objetivo de minimizar inflamações e aumentar a imunidade. Neste caso, 42 gatas adultas (14 gatas/tratamento) com peso médio de $4,9 \pm 0,7$ kg, foram alimentadas com ração suplementada na dosagem de 5:1 (razão entre n-6 e n-3 PUFA), durante o período de 12 semanas, sendo a mesma relação de dosagem utilizada tanto para o óleo de peixe quanto para o óleo de linhaça. Os animais foram alojados em gaiolas (4 a 5 gatos/gaiola) e mantidos em ambiente climatizado a 20°C e 14 horas de luz, conforme procedimentos aprovados pelo comitê de ética animal local. Os resultados mostraram que o grupo alimentado com óleo de peixe apresentou um aumento nas concentrações de EPA e DHA tanto no sangue quanto na pele, enquanto o grupo alimentado com óleo de linhaça apresentou aumento da concentração de ALA (ácido alfa linolênico). Foi observado ainda que tanto o óleo de peixe quanto o óleo de linhaça diminuíram a resposta inflamatória à histamina, sendo assim os autores concluíram que tanto o óleo de peixe quanto o óleo de linhaça podem reduzir a resposta inflamatória da pele, porém foi observado que o óleo de linhaça apresentou menor desempenho imunológico comparado ao óleo de peixe.

Blaskovic *et al.* (2014) também analisaram os efeitos de uma formulação contendo ácidos graxos poli-insaturados e óleos essenciais em cães com dermatite atópica. Portanto, 48 cães de diferentes raças, idades e gêneros diagnosticados com dermatite atópica foram incluídos neste estudo clínico randomizado controlado por placebo. Os cães foram tratados com uma formulação instantânea contendo PUFA e óleos essenciais ou placebo, material aplicado no pescoço dorsal uma vez por semana durante 8 semanas. Os resultados mostraram 50% de melhora no grupo de tratamento em relação ao grupo placebo e não foram observadas reações adversas, indicando portanto, que a preparação tópica contendo PUFA e óleos essenciais foi um tratamento seguro e benéfico na melhora dos sinais clínicos de dermatite atópica canina.

A redução de osteoartrite em cães após a dieta com inclusão de ácidos graxos (ômega 3) foi verificada no trabalho de Mehler *et al.* (2016). Os autores realizaram a pesquisa com 78 cães provindos de clientes e apresentando sinais da doença. Os animais receberam uma dose média de 69 mg de EPA + DHA/kg/dia e os exames ortopédicos e de sangue foram realizados no 42º dia e 84º apresentando resultados clínicos melhores, comparado ao placebo. Desta forma, neste estudo foi demonstrado que a suplementação diária das dietas com EPA e DHA deslocam as concentrações de ácido graxos do sangue correlacionando-as ao alívio dos sinais clínicos associados com a osteoartrite em cães.

O QUADRO 2 resume as bibliografias consultadas nesta revisão e apresenta as principais variáveis e resultados de cada estudo, sendo assim podemos verificar que a aplicação de biomassa de microalgas ainda pode ser melhor explorada, tais como fonte de ácidos graxos poli-insaturados como tentativa de alcançar os mesmos benefícios observados nas dosagens com óleo de peixe, cápsulas de ômega 3, óleo de linhaça, entre outros, bem como fonte protéica natural.

QUADRO 2 – VARIÁVEIS E RESULTADOS DA LITERATURA CONSULTADA

Aditivo	Tipo	Grupo	Idade	Dosagem	Resultado	Ref.
Microalga	<i>Schizochytrium sp.</i>	26 cães	8,6-11,1	0,4%	Melhora cognitiva na senescência	Hadley <i>et al.</i> (2017)
Farinha de alga	<i>Lithothamnium calcareum</i>	10 cães	Adultos	5 g/10 ml água	Melhora na cicatrização	Neto <i>et al.</i> (2010)
Ômega 3	EPA e DHA	20 cães	Adultos	497 e 780 mg	Redução do colesterol	Araujo <i>et al.</i> (2012)
Óleo	Peixe e linhaça	42 gatas	Adultas	5(n-6):1(n-3)	Redução de inflamação na pele	Park <i>et al.</i> (2011)
Formulação tópica	PUFAS + óleos essenciais	48 cães	Variadas	0,6 – 1,2 – 2,4 ml	Melhora dos sinais clínicos em 50% dos pacientes	Blaskovic <i>et al.</i> (2014)
Ômega 3	EPA e DHA	78 cães	Adultos	69 mg	Melhora no quadro clínico de osteoartrite	Mehler <i>et al.</i> (2016)

FONTE: a autora (2016)

2.2.3 Análise termoeconômica – processo de produção da ração

A análise termoeconômica da produção de ração animal foi realizada com base na literatura (BEJAN *et al.* 1996, p. 115-162) e pesquisa bibliográfica para comparação de resultados, porém foram encontrados poucos artigos científicos sobre o tema ligado a fabricação deste produto.

Para o entendimento dos processos e cálculo das dissipações de calor por atrito foi consultada a literatura sobre manuseio e armazenagem de grãos (SILVA, 2008, p. 297-323), este parâmetro influenciou na determinação da temperatura em cada etapa do processo. A mesma fonte foi utilizada para verificação da estrutura, composição e propriedades dos grãos (p. 21-37).

O levantamento dos dados econômicos utilizados no cálculo dos custos das correntes de entrada e saída em cada etapa do processo utilizou como base o informe agroeconômico (SESCOOP/PR, 2013). A análise de custos com energia e fluxograma do processo utilizou como comparativo e consulta um manual de eficiência energética em indústrias de rações para animais (PERRIN *et al.*, 2014, p. 6-39). Os dados dimensionais dos equipamentos e capacidade dos motores foram retirados dos catálogos de especificações dos fabricantes.

Dos estudos sobre o tema podemos citar o artigo de Boyar *et al.* (2012) que avaliou o desempenho do sistema de extrusão de uma fábrica de ração para aquacultura utilizando a análise exergética. As propriedades termodinâmicas foram baseadas em dados reais retirados do sistema condicionador extrusor instalado na fábrica, portanto os valores obtidos para o sistema quanto às eficiências exergéticas foram 25,92% para o condicionador e 2,22% para a extrusora respectivamente.

Carvalho (2013) apresentou outro estudo onde realizou o desenvolvimento de um sistema de dosagem de micronutrientes para ração animal. O autor descreve sobre vários itens importantes para o funcionamento de uma fábrica de ração animal, além de apresentar o fluxograma completo do processo. Ele explica os cálculos relacionados ao dimensionamento de equipamentos, tais como transporte por roscas helicoidais, elevador de caçambas, entre outros.

Conforme citado anteriormente, devido aos poucos trabalhos encontrados nesta área, não foram obtidas literaturas específicas sobre análise termoeconômica em plantas de fabricação de ração considerando todas as etapas do processo. Porém o artigo de Alta e Ertekin (2014) é uma revisão sobre o uso da análise exergética nos processos de produção de alimentos investigando os impactos sobre a utilização da energia e exergia buscando a sustentabilidade sob uma perspectiva termodinâmica. Os conceitos fundamentais são explicados com base na primeira e segunda lei da termodinâmica e na visualização do processo como um diagrama de blocos correspondentes á volumes de controle com correntes de entrada e saída (referentes a operações unitárias tais como secagem, moagem, resfriamento, mistura, etc). Desta

forma, os autores apresentaram os estudos recentes sobre o uso da análise exergética nos processos de produção de alimentos, conforme resumido no QUADRO 3.

QUADRO 3 – ANÁLISE EXERGIECONÔMICA NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

Autor	Produto	Unid. Operação	Objetivo	Resultado
Tekin e Bayramoglu (1998)	Açúcar	Polpa bruta, clarificação, refinação, geração vapor, armaz. de água quente e sist. de vácuo	Produção de açúcar da beterraba	A geração de vapor é resp. por maiores perdas de exergia
Bayrak <i>et al.</i> (2003)	Açúcar	Mosto, destilação, espessamento, refino (cristalização)	Cálculo/estágio utiliz. dados operacionais	Perdas-prod. mosto (vapor e comp. bagaço)
Ram e Banerjee (2003)	Açúcar	Evaporação	Cálculo de evaporadores	Redução perdas em 48% com mudança no equip.
Waheed <i>et al.</i> (2008)	Suco de laranja	Recepção, triagem, limpeza, triturador, centrífuga, tanque retenção, pasteurizador, embalagem, armazém	Consumo energia e destruição de exergia	Perda de 90% na pasteurização
Ensinas <i>et al.</i> (2009)	Açúcar e álcool	Extração, evaporação, fermentação, destilação, cogeração, condensação, resfriamento	Cálculo para um processo integrado açúcar e etanol	Melhorias no sist. de cogeração para minimizar perdas exerg.
Sahin <i>et al.</i> (2010)	Açúcar	Moagem, destilação, espessamento, refino (cristalização)	Cálculo exerg. processo de produção de açúcar	As mais altas efic. exerg. foram 95,1% no caldo e 74,3% no concentrado
Sogut <i>et al.</i> (2010)	Pasta tomate	Evaporador	Avaliar o efeito quadruple por meio de dados atuais do sist.	A mais alta efic. exerg ocorre no primeiro efeito QEEU
Fadare <i>et al.</i> (2010a)	Bebida maltada	Silo, fermentação, filtração, envazamento	Estimar a efic. exerg. no processo de bebidas maltadas	Maior perda na fermentação e menor no envazamento
Bozoglan e Hepbasli (2010)	Óleo oliva	Cogerador, tanques, trocador de calor, destilação, tanques flash, bombas	Identificar pontos de melhoria no processo	Maior perda na caldeira seguida pela destilação e cogeração
Ozilgen e Sorguven (2011)	Óleo soja, girassol, oliva	Coleita, transporte, limpeza, moagem, mistura, decantação, prensagem, extração, refino, pasteurização, envazamento, embalagens	Avaliar energia, exergia, emissão CO ₂	Maior consumo energético produção óleo oliva e maior emissão agricultura
Ozigen e Sorguven (2012)	Iogurte de morango	Prod. Leite, desengorduração, coleita morango, açúcar de beterraba, prod. açúcar, prod. geléia, prod. iogurte aromatiz.	Avaliar energia, exergia, emissão CO ₂	53% de perda na produção leite
Taner e Sivrioglu (2013)	Açúcar	Moagem, prod. mosto, destilação, espessante, refino, secagem, consumo energia	Apresentar eq. exergia e energia do processo de prod. açúcar	Máx economia de energia e mínima perda de exergia

FONTE: Alta e Ertekin (2014).

2.2.4 Modelagem – produção de nutrientes

Os modelos visando representar a produtividade das concentrações de lipídeos e carboidratos foram desenvolvidos em alguns estudos tais como Mairet *et al.* (2011) que complementa o estudo desenvolvido em Mairet *et al.* (2010). Os autores propuseram um modelo dinâmico para o crescimento de microalgas em fotobiorreatores, com base na aproximação ao modelo de Droop (1968 citado por Mairet, 2011), incluindo os efeitos da incidência de luz e nitrogênio na produção de biomassa, carboidratos e lipídeos. A distribuição de irradiação no fotobiorreator foi representada com boa exatidão pela exponencial decrescente de Beer-Lambert. A validação do modelo foi realizada em comparação com os dados experimentais do cultivo da microalga *Isochrysis affinis galbana* em ciclos diurnos e noturnos. O modelo foi aprovado para auxiliar na definição e avaliação de diferentes estratégias de cultura da microalga em questão.

Um estudo recente foi desenvolvido por Deschênes e Wouwer (2015) que apresentam uma abordagem para a otimização dinâmica da produtividade de biomassa em culturas contínuas de microalgas utilizando a intensidade da luz como variável manipulada. Os dados experimentais foram coletados de dois modelos diferentes de crescimento de microalgas e as simulações, para conferência do modelo, foram realizadas em tempo real por meio da aplicação de um controle para busca da melhor condição. O controlador utilizou como referência a taxa de intensidade de luz, para otimizar a absorção de nutrientes da corrente de efluentes, e/ou a produção de biomassa. A microalga *Isochrysis affinis galbana* utilizada no experimento foi cultivada em meio autotrófico e sistema contínuo.

Ainda Deschênes e Wouwer (2016) realizaram o desenvolvimento de um modelo dinâmico, porém aplicado à microalga *Scenedesmus obliquus*. Neste caso os parâmetros desconhecidos foram estimados a partir dos dados experimentais coletados da cultura desenvolvida em modo batelada onde foram aplicados pulsos de substrato na entrada e diferentes incidências de luz. O procedimento para determinação dos parâmetros envolveu a minimização de um critério ponderado de mínimos quadrados e os intervalos de confiança foram fornecidos tanto para os parâmetros como para a previsão do modelo. Os resultados obtidos mostraram que a validação do modelo foi satisfatória e, portanto o modelo pode ser utilizado para gerenciamento e controle do cultivo e obtenção de biomassa.

Portanto, do levantamento das obras referentes à modelagem para estimar a produção de lipídeos e carboidratos, a partir das etapas biológicas que ocorrem no organismo celular microalgal, foram encontrados alguns trabalhos referenciando os modelos de Droop (1968), Mairet *et al.* (2010) e (2011) já citados acima, porém não foram encontrados estudos sobre a modelagem da síntese de proteínas a partir de microalgas.

2.3 DESAFIOS

Com base nesta revisão bibliográfica foi possível listar alguns pontos propostos para avaliação futura em cada sub tema. O QUADRO 4 apresenta estes pontos e aponta, com base na relação listada, quais os desafios para este trabalho de pesquisa.

QUADRO 4 – LISTAGEM DOS DESAFIOS E TEMAS FUTUROS PROPOSTOS

Propostas a fazer	Propostas não verificadas nas obras consultadas/subtema		
Desafios encontrados na literatura	Microalgas – ração pets	Análise Termoecon.	Modelagem
<p>Uso da microalga <i>Tetrademus obliquus</i>. Não encontrados registros do uso desta espécie na base de dados pesquisada.</p> <p>Análises quanto a presença de ômega 3 na biomassa de microalga e os efeitos na amostra sanguínea após suplementação</p> <p>Ensaio cometa para verificação do dano ao DNA. Tema não verificado nas obras pesquisadas.</p> <p>Ensaio de digestibilidade e palatabilidade da biomassa da microalga</p> <p>Elaboração de análise termoeconômica envolvendo todas as etapas do processo de produção da ração com adição de biomassa de microalga</p> <p>Elaboração de modelo matemático visando o gerenciamento da produção de proteínas, lipídeos e carboidratos considerando variações das condições de cultivo</p>	<p>Avaliar diferentes espécies de microalgas</p> <p>Verificar biomassa como suplemento de ômega 3</p> <p>Estudar influência de pigmentos na saúde animal</p> <p>Analisar toxicidade, palatabilidade e digestibilidade devido a suplementação com biomassa algal</p> <p>Verificar a existência ou não de mudanças em relação ao colesterol e triglicérides</p> <p>Verificar perfil sanguíneo sobre efeito da suplementação com biomassa de microalga</p>	<p>Avaliar a adição de diferentes espécies de microalgas</p> <p>Calcular o custo exergético da ração considerando a dosagem de biomassa seca</p> <p>Realizar os cálculos de exergia para todos os equipamentos presentes no processo de produção de ração para pets</p> <p>Levantar custos das correntes de entrada e saída em todas as etapas do processo considerando adição da biomassa seca de microalgas</p>	<p>Elaborar modelo para gerenciar produtividade de proteínas, lipídeos e carboidratos na biomassa de microalga em função de variações ambientais.</p> <p>Atrelar, por meio de estudo de caso, os resultados do modelo após validação, à possibilidade de aplicação industrial para gerenciamento da qualidade da biomassa de microalga.</p>

FONTE: a autora (2016).

2.4 OBJETIVOS

2.4.1 Objetivos geral

O trabalho tem como objetivo geral a adição da biomassa da microalga *Tetrademus obliquus* em ração canina, com modelagem matemática do processo produtivo e da geração de nutrientes.

2.4.2 Objetivos específicos

A fim de atingir o objetivo geral, o trabalho foi dividido em objetivos específicos alcançados sequencialmente ou simultaneamente:

- a) Caracterização da biomassa da microalga;
- b) Análise microbiológica;
- c) Caracterização da ração suplementada;
- d) Análise termoeconômica do processo de produção da ração;
- e) Elaboração do modelo matemático;
- f) Meio de cultivo - crescimento;
- g) Obtenção dos dados experimentais;
- h) Validação do modelo;
- i) Ensaio com cães;
- j) Coleta e análise das amostras biológicas;
- k) Tratamento estatístico dos dados.

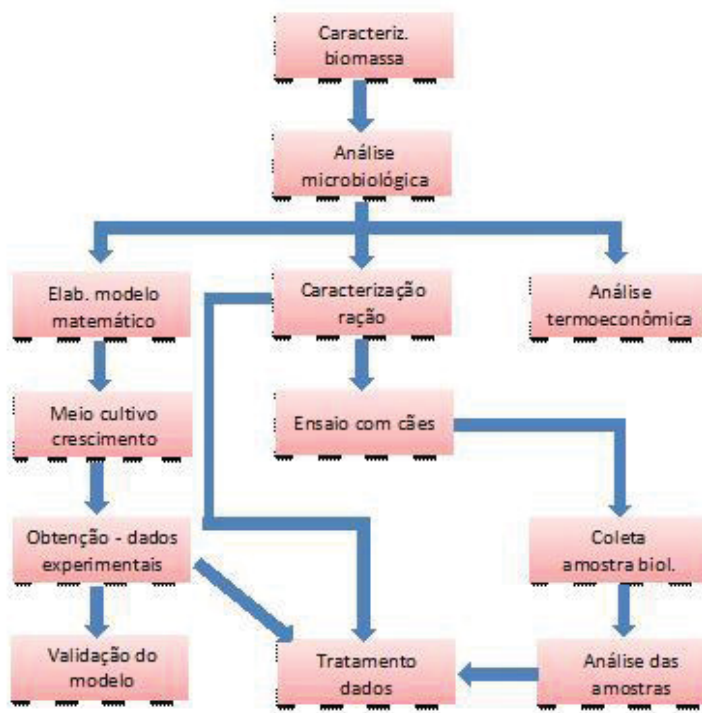
3 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho de pesquisa está dividido conforme fluxograma apresentado na FIGURA 7. A primeira etapa é a caracterização da biomassa da microalga *Tetrademus obliquus*, cedida pelo NPDEAS, buscando identificar elementos de valor nutricional significativo com base nas exigências especificadas nas tabelas e normas de nutrição animal.

Uma vez identificadas às propriedades de interesse, tais como proteínas, lipídeos entre outros, fez-se necessário o tratamento microbiológico para garantir a qualidade de segurança alimentar conforme Instrução Normativa 4/2007 (item 6.1.2)

estabelecida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Na segunda etapa foi desenvolvido, simultaneamente, a análise termoeconômica, a elaboração do modelo matemático e os testes de alimentação suplementada com os cães.

FIGURA 7 - FLUXOGRAMA COM AS ETAPAS DA PESQUISA



FONTE: a autora (2017)

A terceira etapa consistiu na coleta das amostras biológicas, bem como a caracterização da ração suplementada com relação às propriedades energéticas e nutricionais e acompanhar os meios de cultura em escala laboratorial para coleta dos dados experimentais, os quais posteriormente serão utilizados para a validação do modelo. Por fim, a última etapa foi composta pela análise das amostras biológicas.

As metodologias utilizadas nos ensaios da biomassa da microalga e amostras coletadas estão detalhadas na TABELA 1, assim como as suas referências. Desta forma, após pesquisa bibliográfica e adequação as ferramentas e materiais existentes em laboratório, os procedimentos de ensaio utilizados na pesquisa foram identificados.

TABELA 1 – METODOLOGIAS DE ENSAIO

Etapa	Característica	Referência
Caracterização da biomassa	Resíduo Min.	CBAA (2009) – Met.36
	Cálcio	CBAA (2009) – Met. 8
	Fósforo	CBAA (2009) – Met. 25
	Sódio	Domingues (2012)
	Potássio	Domingues (2012)
	Extrato Etéreo	CBAA (2009) – Met. 15
	Fibra Bruta	CBAA (2009) – Met. 19
	Fibra (FDA)	CBAA (2009) – Met. 20
	Fibra (FDN)	CBAA (2009) – Met. 21
	Energia Bruta	Poli <i>et al.</i> (2013)
	Proteína Bruta	IAL (2008)/NREL (2015)
	Lípido Total	Blight e Dyer (1959)
	Clorofila a,b	He <i>et al.</i> (2015)
	Carotenóide t.	He <i>et al.</i> (2015)
	Perfil lipíd.	Hartman e Lago (1973)
Análise microbiológica	Salmonella	Oliveira (2013) – Colilert
	Coliformes t.	e
	E. coli	CBAA (2009) – Met. 4
Caracterização da ração	Ídem biomassa	Ídem biomassa
Análise: amostras do cultivo	Lípido Total	Blight e Dyer (1959)
	Proteína Bruta	IAL (2008)/NREL (2015)
	Carboidratos	Dubois <i>et al.</i> (1956)
Análise: amostras biológicas	ALT/TGP	IFCC (2002)
	Colesterol tot	Araujo <i>et al.</i> (2012)
	Triglicerídeos	Araujo <i>et al.</i> (2012)
	Hemograma	Oliveira, I.N.V. <i>et al.</i> (2013)
	Digestibilidade	Zanatta <i>et al.</i> (2013)

FONTE: a autora (2017)

As metodologias mais antigas de Hartman e Lago (1973), Blight e Dyer (1959) e Dubois et al. (1956) são protocolos aplicados e citados até hoje com desempenho satisfatório, conforme verificado na literatura pesquisada. Os ensaios aplicados à caracterização da biomassa de microalga foram, em sua maioria, retirados do guia de métodos analíticos contidos no Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal (CBAA, 2009) e realizados no laboratório de Nutrição Animal do setor de Zootecnia da UFPR. A proteína bruta foi analisada conforme metodologia descrita no manual de métodos físico-químicos para análise de alimento elaborado pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008).

Os ensaios para leitura e identificação do perfil lipídico foram realizados com apoio dos laboratórios de Catálise Heterogênea e Biodiesel (LCHBio) da Universidade Estadual de Maringá e no laboratório de Química da UFPR. Quanto às análises das amostras de sangue, foram realizadas pelo laboratório clínico do Hospital Veterinário da UFPR, campus Agrárias.

A análise termoeconômica foi realizada com base no fluxograma esquemático de uma planta de ração animal e as especificações dos equipamentos para os cálculos de dimensionamento foram retiradas dos catálogos dos fabricantes.

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA DA MICROALGA

A biomassa utilizada neste estudo foi originada da espécie de microalga *Tetrademus obliquus*, isolada pelo NPDEAS (UFPR) a partir da rede de abastecimento de água e cultivada em fotobiorreatores compactos com capacidade de 10 m³. A biomassa seca foi caracterizada por meio dos ensaios para determinação de cinzas (resíduo mineral), umidade, proteína bruta, extrato etéreo, fibra bruta, FDA (fibra em detergente ácido), FDN (fibra em detergente neutro), cálcio, fósforo, sódio, potássio, energia bruta, lipídeos totais, perfil lipídico.

3.1.1 Determinação de cinzas (resíduo mineral)

Segundo definição CBAA (2009), o teor de cinzas ou matéria mineral é o resíduo resultante da queima da amostra a uma temperatura de 550 a 600 °C, fornecendo dados da quantidade de minerais totais contidos no produto de origem vegetal, animal ou misturas. Os materiais necessários para realização deste ensaio são:

- Equipamentos: balança analítica (resolução 0,0001 g) e forno mufla.
- Materiais: Cadinhos e dessecador com sílica gel.

O procedimento (método nº 36) consistiu em pesar os cadinhos (foram feitas triplicatas), limpos e previamente calcinados em mufla a 550–600 °C por 30 minutos e depois foram resfriados em dessecador até equilíbrio com a temperatura ambiente (os cadinhos foram calcinados em um dia e deixados em dessecador para uso no dia seguinte). As amostras foram pesadas (2 a 3 g) e colocadas nos cadinhos já pesados e tarados, os cadinhos com amostras foram levados a mufla, aumentando

gradualmente a temperatura (550-600 °C) até obtenção de cinzas claras (3 horas no mínimo). Retirou-se a 250-300 °C, esfriando em dessecador até equilíbrio com a temperatura ambiente e então pesar. A FIGURA 8 apresenta o forno mufla utilizado para processar as amostras e o teor de cinzas é determinado pelo seguinte cálculo:

$$Cinzas(\%) = \frac{(A-B)}{C} \times 100 \quad (1)$$

Onde;

A = peso do cadinho + resíduo (g)

B = peso do cadinho (g)

C = peso da amostra (g)

FIGURA 8 - FORNO MUFLA UFPR

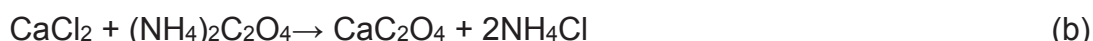
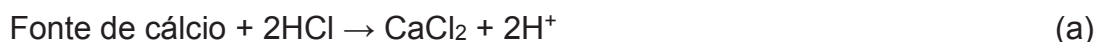


FONTE: a autora (2017)

As cinzas obtidas neste ensaio foram devidamente guardadas em reservatório fechado e selado para evitar contato com meio externo, uma vez que em seguida foram utilizadas para determinação de cálcio, fósforo e sódio.

3.1.2 Determinação cálcio - oxidimetria

O método nº 8 do CBAA (2009) descreve a obtenção do cálcio como um precipitado na forma de oxalato que é lavado e dissolvido em ácido sulfúrico diluído. Sendo assim, o ácido oxálico gerado é, então, titulado com a solução padrão de permanganato de potássio. As reações envolvidas são listadas nos seguintes passos:



- Reagentes: ácido clorídrico (HCl) p.a.; ácido sulfúrico (H₂SO₄) p.a.; hidróxido de amônio (NH₄OH) p.a.; oxalato de amônio ((NH₄)₂C₂O₄.H₂O) p.a.; oxalato de sódio (Na₂C₂O₄) p.a.; permanganato de potássio (KMnO₄) p.a.; vermelho de metila p.a.

- Materiais: papel de filtro qualitativo; balões volumétricos; bastão de vidro; béquer de 250 ou 300 mL; bureta de 50 mL; cadinho de porcelana ou quartzo; cadinho de vidro borossilicato com placa porosa (10 a 16 micra); funil analítico; pipetas graduadas; pipetas volumétricas; proveta de 50 mL e vidro de relógio.

- Equipamentos: balança analítica; placa aquecedora; estufa.

Preparo das soluções reagentes:

- Solução de ácido clorídrico (1:1): diluir uma parte de HCl em uma parte de água destilada.

- Solução de ácido clorídrico (1:3): diluir uma parte de HCl para três partes de água destilada.

- Solução de ácido sulfúrico (1:1): diluir uma parte de H₂SO₄ para uma parte de água destilada.

- Solução de hidróxido de amônio (1:1): diluir uma parte de NH₄OH em uma parte de água destilada.

- Solução de oxalato de amônio saturada: pesar 70 g de oxalato de amônio e transferir para béquer de 2000 mL, completar o volume com água destilada para 1000 mL, aquecer até a completa dissolução e esfriar a temperatura ambiente.

- Solução de hidróxido de amônio (1:50): diluir uma parte de NH₄OH em 50 partes de água destilada.

- Solução volumétrica padronizada de permanganato de potássio 0,01 M: dissolver 1,6 g de KMnO_4 em béquer contendo aproximadamente 300/400 mL de água destilada e aquecer até 60/70 °C por 2 horas. Em seguida, esfriar e transferir quantitativamente para balão volumétrico de 1000 mL, completar o volume e homogeneizar. Deixar em repouso por no mínimo 12 horas ao abrigo da luz. Filtrar sobre o cadinho de vidro sintetizado e estocar em frasco âmbar.

- Solução alcoólica indicadora de vermelho de metila 0,1%: dissolver 0,1 g de vermelho de metila em aproximadamente 40 mL de água destilada e transferir para balão volumétrico de 100 mL, completar o volume com etanol e homogeneizar.

Para a padronização pesar 3,35 g de oxalato de sódio, previamente seco em estufa a 105 °C por 2 horas, dissolver em béquer com aproximadamente 100 mL de água destilada e transferir para um balão volumétrico de 1000 mL, completar o volume e homogeneizar. Posteriormente pipetar 20 mL de solução de oxalato de sódio, transferir para erlenmeyer de 250 mL e adicionar 10 mL de ácido sulfúrico (1:1). A solução é então aquecida a 70/80 °C e titulada nessa temperatura gotejando a solução de permanganato de potássio 0,01 M, o ponto de virada é marcado pela coloração levemente rósea e persistente por 30 segundos.

O primeiro passo para realizar este ensaio consiste em preparar a solução estoque que será utilizada também para determinação de fósforo. Sendo assim as cinzas, obtidas no ensaio anterior, são transferidas, com auxílio de bastão de vidro, para béquer de 250/300 mL, então o cadinho é lavado com pequenas porções da solução de HCl (1:1) totalizando 40 mL, em seguida lavar com água destilada cobrir com vidro de relógio e levar à placa aquecedora até que haja redução de 1/3 do volume. Esfriar e transferir para balão volumétrico de 100 mL, completar o volume e homogeneizar.

A partir da solução estoque, pipetar uma alíquota, filtrar e transferir para béquer de 250/300 mL. Adicionar 2 a 3 gotas de vermelho de metila 0,1% e diluir com água destilada até aproximadamente 50 mL. Aquecer em placa aquecedora até próximo à fervura, então acrescentar sob agitação constante 25 mL da solução saturada de oxalato de amônio quente. Adicionar NH_4OH (1:1), gota a gota sob agitação constante, até que a coloração mude de vermelho para rosa. Deixar em repouso por no mínimo 1 hora. Filtrar sob vácuo em cadinho de vidro borossilicato com placa porosa, lavar o béquer e o precipitado 3 vezes com NH_4OH (1:50). Aquecer até completa dissolução do precipitado e titular com permanganato de potássio 0,01

M sob constante agitação até coloração rósea clara, persistente por 30 segundos. Durante a titulação a temperatura deve permanecer abaixo de 60 °C. A seguir, apresenta-se o cálculo da porcentagem de cálcio na amostra.

$$\text{Cálcio}(\%) = \frac{(V \times M \times 0,02004 \times S \times 100)}{P \times A} \quad (2)$$

Onde;

V = volume de KMnO₄ (0,01 M) (mL)

M = molaridade real da solução KMnO₄ (0,01 M)

S = volume da solução estoque (mL)

P = peso da amostra (g)

A = volume da alíquota utilizada (mL)

0,02004 = 1 mL de permanganato de potássio 0,01 M equivale a 0,02004 g de cálcio

3.1.3 Determinação fósforo

O método nº 25 do CBAA (2009) define que a determinação do fósforo se fundamenta no ataque químico fortemente ácido e a quente seguida da formação do complexo colorido entre o fosfato e os reagentes vanadato e molibdato de amônio, cuja absorbância é medida na faixa de 400 a 430 nm.

- Reagentes: metavanadato de amônio (NH₄VO₃) p.a ; molibdato de amônio ((NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O) p.a.; ácido nítrico (HNO₃) p.a.; fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) p.a.

- Materiais: béquer; balão volumétrico; bastão de vidro; pipetas, vidro de relógio; provetas.

- Equipamentos: balança analítica; placa aquecedora; fotolorímetro ou espectrofotômetro, estufa.

Preparação das soluções reagentes:

- Solução de metavanadato de amônio: pesar 2,5 g de metavanato de amônio e solubilizar em 500 mL de água destilada quente. Deixar esfriar e adicionar lentamente, com agitação, 350 mL de HNO₃, esfriar e transferir a solução para balão

volumétrico de 1000 mL, completar o volume com água destilada e homogeneizar (estocar ao abrigo da luz).

- Solução de molibdato de amônio: pesar 50 g de molibdato de amônio e solubilizar em 500 mL de água destilada, completar com água destilada quente (60-70 °C), esfriar e transferir a solução para balão volumétrico de 1000 mL.

- Solução reagente misto: consiste em juntar uma parte da solução de metavanadato de amônio com uma parte da solução de molibdato de amônio e homogeneizar.

- Solução padrão de fósforo a 0,1 mg/mL: pesar 0,4394 g de KH_2PO_4 , previamente seco em estufa a 105 °C por duas horas, solubilizar e transferir quantitativamente para balão volumétrico de 1000 mL. Adicionar aproximadamente 500 mL de água destilada para completa dissolução, completar o volume e homogeneizar.

O procedimento de análise consiste em pipetar volumetricamente, para um balão de 100 mL, alíquotas da solução estoque de maneira que a leitura esteja em uma faixa de 40% a 71% de transmitância ou 0,100 a 0,800 de absorbância. Em seguida adicionar 20 mL do reagente misto, completar com água destilada e aguardar 30 minutos para efetuar a leitura. A leitura de absorbância deve ser realizada após zerar com o branco, usando comprimento de onda de 420 nm ou 400 e 430 nm por meio de varredura do melhor pico de absorbância. Os cálculos para determinação do percentual de fósforo na amostra são desenvolvidos a seguir, e a FIGURA 9 apresenta o fotocolorímetro utilizado na análise.

$$C = \frac{LA}{LP} \times \text{valor do padrão} \quad (3)$$

Onde;

C = concentração de fósforo na alíquota (mg)

LA = leitura da amostra

LP = leitura do padrão

$$\text{Fósforo total (\%)} = \frac{Cx_B}{Px_A} \times 100 \quad (4)$$

Onde;

B = volume inicial do balão (mL)

P = peso da amostra (g)

A = volume da alíquota (mL)

FIGURA 9 - FOTOCOLORÍMETRO



FONTE: a autora (2017)

3.1.4 Determinação sódio e potássio

Segundo IAL (2008, p. 379) quantidades traços de íons sódio e potássio podem ser determinadas por fotometria de emissão de chama, sendo que o sódio emite luz amarela com comprimento de onda na faixa de 565 a 590 nm e o potássio cor violeta (380 a 440 nm).

- Reagentes: cloreto de sódio (NaCl) p.a.; cloreto de potássio (KCl) p.a.
- Materiais: bastão de vidro; balão volumétrico de 100 mL; pipeta volumétrica; béquer de 50 mL.
- Equipamentos: fotômetro de chama com filtros para sódio e potássio; bomba de vácuo, estufa; dessecador; balança analítica.

Preparo das soluções reagentes:

- Solução padrão de íons sódio: pesar 2,5421 g de cloreto de sódio, previamente seco em estufa a 105⁰C por 3 horas e resfriado em dessecador. Transferir para um balão volumétrico de 1000 mL, completar com água destilada e homogeneizar.

- Solução padrão de íons potássio: pesar 1,9067 g de cloreto de potássio, seco em estufa a 105°C por 3 horas e resfriado em dessecador. Transferir para um balão volumétrico de 1000 mL, completar com água destilada e homogeneizar.

Procedimento: ajuste o comprimento de onda para os íons sódio ou potássio ou coloque os filtros adequados para determinação de sódio e potássio, então zere a escala de medida com água destilada. Transferir 40 mL da solução estoque para um béquer seco e limpo, agitar. Com o fotômetro calibrado e zerado efetuar a leitura da amostra. Sempre checar o zero da escala do aparelho com água destilada, entre as medidas. O aparelho utilizado para esta análise é o mesmo da análise de fósforo representado na FIGURA 9.

3.1.5 Determinação da proteína bruta

Conforme IAL (2008, p. 123-125), a determinação da proteína bruta baseia-se na determinação de nitrogênio, tais como realizado no método Kjeldahl. Este método, idealizado em 1883, tem sofrido diversas modificações e adaptações, porém sempre se baseia em três etapas: digestão, destilação e titulação. Desta forma, a matéria orgânica existente na amostra (neste caso a amostra é a biomassa seca) é decomposta com ácido sulfúrico concentrado e sulfato de cobre como catalisador, então o nitrogênio é transformado em sal amoniacal. Em seguida, no processo de destilação, a amônia é liberada do sal amoniacal pela reação com hidróxido e transferida para uma solução ácida de volume e concentração conhecidos. Por fim, na titulação determina-se a quantidade de nitrogênio presente na amostra titulando-se o excesso de ácido utilizado na destilação com hidróxido. Para transformar a quantidade de nitrogênio obtida em proteínas utiliza-se um fator de conversão que possui diferentes valores dependendo do tipo de alimento. No caso da biomassa de microalgas este fator é 4,78 conforme NREL (2015, p. 4).

- Reagentes: ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado; sulfato de cobre (CuSO_4); sulfato de potássio (K_2SO_4); dióxido de titânio (TiO_2); solução de fenolftaleína ($\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{O}_4$); solução de ácido sulfúrico a 0,05 M; solução indicadora (vermelho de metila 1%); zinco em pó; hidróxido de sódio a 30% (NaOH); hidróxido de sódio 0,1 M.

- Materiais: béquer; bureta 25 mL; balões de Kjeldahl de 800 mL; balão de destilação; erlenmeyer de 500 mL; espátula, papel de seda; pipeta de 25 mL graduada.

- Equipamentos: balança analítica; digestor Kjeldahl; conjunto de destilação; chapa aquecedora; titulador.

Antes de iniciar o procedimento as soluções reagentes foram preparadas:

Mistura catalítica formada por dióxido de titânio anidro, sulfato de cobre anidro e sulfato de potássio anidro, na proporção 0,3:0,3:6 (sólidos).

O procedimento para o ensaio consistiu em pesar 1 g da amostra (biomassa seca) em papel de seda e transferir o conjunto (papel + amostra) para o balão Kjeldahl. Em seguida foi adicionado 25 mL de ácido sulfúrico e cerca de 6 g da mistura catalítica, levou-se ao aquecimento em chapa aquecedora, na capela, até a solução se tornar azul esverdeada e livre do material não digerido e deixou-se em aquecimento por mais uma hora. Deixou-se esfriar e a solução foi transferida para o aparelho de destilação, então com a solução no balão de destilação foram adicionadas 10 gotas do indicador fenolftaleína e 1 g de pó de zinco. No aparelho de destilação a extremidade afilada do refrigerante foi mergulhada em 25 mL de ácido sulfúrico 0,05 M contido em frasco erlenmeyer de 500 mL com 3 gotas do indicador vermelho de metila. Ao frasco que contém a amostra digerida foi adicionada a solução de hidróxido de sódio 30%. Os recipientes foram aquecidos até a ebulição e destilou-se até a obtenção de 250-300 mL do destilado. O excesso de ácido sulfúrico 0,05 M foi titulado com solução de hidróxido de sódio 0,1 M usando vermelho de metila. A equação a seguir permite calcular o percentual de proteína contido na amostra e a FIGURA 10 apresenta algumas etapas do ensaio:

$$Proteína\ bruta(\%) = \frac{((Vb - Vt) \times 0,0014 \times f)}{P} \times 100 \quad (5)$$

Onde;

Vb = volume do branco (mL)

Vt = volume gasto na titulação (mL)

P = peso da amostra (g)

f = fator de conversão

FIGURA 10 - PREPARAÇÃO AMOSTRA, DIGESTÃO E DESTILAÇÃO



FONTE: a autora (2017)

3.1.6 Determinação da fibra bruta

A fibra bruta é o resíduo insolúvel que se obtém após o tratamento sucessivo da amostra com ácidos e álcalis diluídos a quente, que representa a fração que contém celulose, hemicelulose, lignina e suberina dos ingredientes. O teor de fibra bruta está relacionado à fração indigestível e por consequência à energia, entretanto por si só não representa o valor nutricional da amostra, CBAA (2009).

- Reagentes: acetona (C_3H_6O) p.a.; ácido sulfúrico (H_2SO_4) p.a.; álcool etílico (C_2H_5OH) p.a.; álcool octílico ($C_8H_{18}O$) ou álcool amílico ($C_5H_{12}O$) ou solução antiespumante; éter de petróleo, fibras de óxido de alumínio ou de silicato de alumínio; hidróxido de sódio ($NaOH$) p.a.

- Materiais: balão de fundo chato 250 mL com junta esmerilhada 24/40; cadinho de Gooch 40/50 mL ou cadinho de vidro borossilicato com placa porosa (90 a 150 micra); condensador de bolas; dessecador com cloreto de cálcio ou sílica gel anidros; funil de Buchner ± 10 cm de diâmetro; tela de nylon de 100 mesh ou similar e tubo digestor de fibra 350 mL.

- Equipamentos: aparelho extrator de fibra; balança analítica; bomba de vácuo; estufa; manta aquecedora; mufla.

Preparo de soluções:

- Solução reagente de ácido sulfúrico 1,25%: medir 7,0 mL de ácido sulfúrico e transferir para balão volumétrico de 1000 mL, contendo aproximadamente 500 mL de água destilada. Esfriar, completar o volume homogeneizando. Padronizar com NaOH 0,2 M e considerar adequada quando estiver entre 0,504 e 0,516 M.

- Solução reagente de hidróxido de sódio 1,25%: pesar exatamente 12,5 g de NaOH em béquer, solubilizar com água e transferir quantitativamente para balão volumétrico de 1000 mL. Esfriar, completar o volume e homogeneizar. Padronizar com ácido sulfúrico 0,4 M, considerar adequada entre 0,310 e 0,316 M.

O procedimento consiste em pesar 3 g da amostra e transferir para o tubo digestor, béquer, erlenmeyer ou cadinho de borossilicato. Adicionar 200 mL de ácido sulfúrico 1,25% (para sistema automático injetar 150 mL e algumas gotas de antiespumante). Digerir em refluxo por exatamente 30 minutos a partir da ebulição. Filtrar quantitativamente a quente sob vácuo, em funil de Bucher provido de tela de nylon ou cadinho de vidro borossilicato. Proceder a lavagens sucessivas do resíduo com água fervente até completa neutralização. Então se retorna o resíduo ao tubo, béquer ou erlenmeyer, lavando a tela com 200 mL de hidróxido de sódio 1,25% (para sistema automático injetar 150 mL), digerir em refluxo por exatamente 30 minutos a partir do início da ebulição, em seguida transferir a quente sob vácuo em funil de Buchner provido de tela de nylon. Transferir quantitativamente o resíduo com auxílio de água quente para cadinho de vidro borossilicato contendo camada densa de fibras de silicato de alumínio ou fibras de óxido de alumínio (não permitindo a passagem do resíduo durante a filtração). Lavar com porções de água quente e em seguida com aproximadamente 20 mL de álcool etílico e 20 mL de acetona. Levar para estufa a 105 °C até peso constante (4 a 6 horas), retirar, esfriar em dessecador até equilíbrio com a temperatura ambiente e pesar. Por último incinerar em mufla à 550-600 °C por 2 horas, retirando a temperatura de 250-300 °C, esfriar em dessecador e pesar. A equação a seguir calcula o valor do percentual de fibra bruta na amostra e a FIGURA 11 apresenta o aparelho extrator de fibra.

$$Fibra\ bruta(\%) = \frac{(A-B)}{P} \times 100 \quad (6)$$

Onde;

A = peso do cadinho + resíduo (g)

B = peso do cadinho (g)

P = peso da amostra (g)

FIGURA 11 - APARELHO EXTRATOR DE FIBRA



FONTE: a autora (2017)

3.1.7 Determinação da fibra detergente ácido (F.D.A)

O ensaio de determinação da F.D.A utiliza o mesmo aparelho extrator de fibra da FIGURA 11, porém neste caso a amostra é digerida em solução de detergente ácido que solubiliza o conteúdo celular, a hemicelulose, os minerais solúveis e a maior parte da proteína insolúvel, deixando inalteradas as frações de lignina e celulose. Geralmente utilizado como estimador da fração de difícil digestão, CBAA (2009).

- Reagentes: acetona; ácido sulfúrico; CTAB (brometo de cetil-trimetilamônio ($C_{19}H_{42}BrN$)).

- Materiais: béquer 600 mL forma alta ou erlenmeyer 500 mL com junta esmerilhada; cadinho de vidro borossilicato com placa porosa (90 a 150 micra), Kitassato, pissetas.

- Equipamentos: balança analítica; bomba de vácuo; aparelho extrator (unidade de refluxo); estufa; placa aquecedora.

Preparo das soluções reagentes:

- Solução reagente de ácido sulfúrico 2 M: medir 30 mL de H₂SO₄ e transferir para balão volumétrico de 1000 mL contendo aproximadamente 500 mL de água destilada, esfriar, completar o volume e homogeneizar.

- Solução detergente ácido: pesar 20 g de CTAB e adicionar em 1 L de solução de H₂SO₄ 2 M, agitando até a completa dissolução.

O procedimento para esta análise consiste em pesar 1 g da amostra e transferir para tubo digestor do aparelho extrator de fibra, em seguida adicionar 100 mL de solução detergente ácido, escorrendo-a lentamente pela parede do tubo e evitando formação de espuma. Colocar o tubo do bloco digestor a 150 °C, acoplado ao condensador de refluxo. Após atingir a ebulição, reduzir a temperatura para 100 °C e digerir por 1 hora, sendo que durante a digestão deve-se observar se partículas de amostra aderem à parede do tubo acima do nível da solução (se isto acontecer lavar as paredes com o mínimo de água destilada). Quando terminar a digestão, filtrar amostra sob vácuo em cadinho de placa porosa, previamente tarado, utilizando o kitassato como auxílio. Transferir o conteúdo do tubo para cadinho utilizando pisseta com água quente e tomar cuidado para que toda a amostra seja transferida. Lavar o filtrado no mínimo 3 vezes com água destilada quente, permitindo que fique de molho por 2 minutos. Lavar, igualmente, o filtrado com acetona 2 vezes, permitindo que fique de molho por 2 minutos, então retirar o cadinho do kitassato e secar em estufa por 4 a 6 horas a 105 °C ou até peso constante, retirar da estufa e deixar esfriar em dessecador e pesar. Para o cálculo do percentual de fibra detergente ácido foi utilizada a seguinte correlação:

$$Fibra\ deterg.\ ácida(\%) = \frac{(A-B)}{P} \times 100 \quad (7)$$

Onde;

A = peso do cadinho + resíduo (g)

B = peso do cadinho (g)

P = peso da amostra (g)

3.1.8 Determinação da fibra detergente neutro (F.D.N)

No caso da fibra detergente neutro, a amostra é digerida em solução de detergente neutro que solubiliza o conteúdo celular, formado principalmente de proteínas, gorduras, carboidratos solúveis, pectina e outros constituintes solúveis em água. A F.D.N corresponde às frações de celulose, lignina e hemicelulose que não são digeridas e à fibra dietética para não ruminantes, CBAA (2009).

- Reagentes: acetona; alfa amilase; borato de sódio ($B_4Na_2O_7 \cdot 10H_2O$); E.D.T.A dissódico ($C_{10}H_{12}CaN_2Na_2O_8$); fosfato dissódico (Na_2HPO_4); lauril sulfato de sódio ($C_{12}H_{25}NaO_4S$); trietilenoglicol ($C_6H_{14}O_4$).

- Materiais: béquer 600 mL forma alta ou erlenmeyer de 500 mL com junta esmerilhada; cadinho de vidro borossilicato com placa porosa (90 a 150 micra); dessecador; kitassato e pisseta.

- Equipamentos: balança analítica; bomba de vácuo; conjunto para determinação de fibra bruta (unidade de refluxo), estufa e placa aquecedora.

O procedimento consiste em pesar 1 g de amostra e transferir para o tubo digestor do aparelho extrator de fibra (FIGURA 11); então adicionar 100 mL de solução de detergente neutro, adicionando também 0,5 mL de alfa amilase. Colocar o tubo digestor a 150 °C, acoplado ao condensador de refluxo. Após atingir a ebulição reduzir a temperatura do bloco para 100 °C e digerir por 1 hora, durante a digestão observar se partículas de amostra aderem à parede do tubo acima do nível da solução. Terminada a digestão, filtrar a amostra sob vácuo em cadinho de placa porosa, previamente tarado, utilizando o kitassato como auxílio então transferir todo o conteúdo para o cadinho utilizando pisseta com água quente. Lavar o filtrado 3 vezes com água destilada quente, permitindo que fique de molho por 2 minutos e em seguida lavar 2 vezes com acetona, deixando de molho por 2 minutos. Por fim, retirar o cadinho do kitassato e secar em estufa por 4 a 6 horas a 105 °C, deixar esfriar e pesar. O cálculo de percentual de fibra detergente neutro foi feito como se segue:

$$Fibra\ deterg.\ neutro(\%) = \frac{(A-B)}{P} \times 100 \quad (8)$$

Onde;

A = peso do cadinho + resíduo (g)

B = peso do cadinho (g)

P = peso da amostra (g)

3.1.9 Determinação de extrato etéreo

O extrato etéreo é definido como o total de substâncias solúveis em solventes orgânicos, sendo essas substâncias os acilgliceróis, os ácidos graxos livres, o colesterol, a lecitina, a clorofila, os alcoóis voláteis, os óleos voláteis e as resinas, CBAA (2009).

- Reagentes: éter de petróleo p.a.; éter etílico p.a.; ácido clorídrico p.a.; álcool etílico p.a.

- Materiais: béquer 250 mL; erlenmeyer com tampa esmerilhada 250 mL, funil analítico; pipetas graduadas de 5 mL; proveta de 50 mL e algodão hidrófilo; dessecador.

- Equipamentos: balança analítica; estufa; banho-maria.

Preparo das soluções reagentes:

- Solução de ácido clorídrico 70%: misturar 7 partes de HCl em 3 partes de água destilada.

- Solução de éter de petróleo – éter etílico (1:1): misturar 1 parte de éter de petróleo em 1 parte de éter etílico.

O procedimento para determinação do extrato etéreo consiste em pesar 2 g de amostra e em seguida transferir para um erlenmeyer de 250 mL. Adicionar 2 mL de álcool etílico e agitar de maneira a umedecer todas as partes da amostra, em seguida adicionar 10 mL de ácido clorídrico 70%, tampar e agitar vigorosamente. Levar ao banho-maria a temperatura de 70-80 °C e manter por 40 minutos, agitando a cada 10 minutos. Remover o frasco do banho-maria e deixar a temperatura ambiente, então adicionar 10 mL de álcool etílico e agitar vigorosamente, adicionar 50 mL da solução de éter de petróleo – éter etílico^a, tampar e agitar vigorosamente durante 30 segundos. Remover cuidadosamente a tampa e deixar os vapores saírem, então lavar a tampa com pequenas porções de solução de éter de petróleo – éter etílico, transferindo a gordura e partículas aderidas para dentro do frasco. Tampar e deixar em repouso até que o sobrenadante esteja praticamente límpido, filtrar o sobrenadante sobre algodão firmemente adaptado em funil^b, para béquer de 250 mL previamente seco em estufa a 105 °C e tarado. Novamente lavar o bico do frasco e tampa, após a transferência com pequenas porções de solução de éter de petróleo – éter etílico e repetir no mínimo 3 vezes os itens a,b, usando 25 mL da solução de éter de petróleo – éter etílico. Completadas todas as extrações, lavar com solução de éter

de petróleo – éter etílico o bico do frasco, a tampa, o algodão (até o desaparecimento da cor amarela), o funil e a haste do funil. Evaporar a mistura de éteres em banho-maria na temperatura máxima de 60 °C e levar o béquer na estufa a 105 °C por 30 minutos ou até peso constante, esfriar em dessecador e pesar. O cálculo do percentual de extrato etéreo foi feito como se segue:

$$Ext. \text{ etéreo}(\%) = \frac{(A-B)}{P} \times 100 \quad (9)$$

Onde;

A = peso do cadinho + resíduo (g)

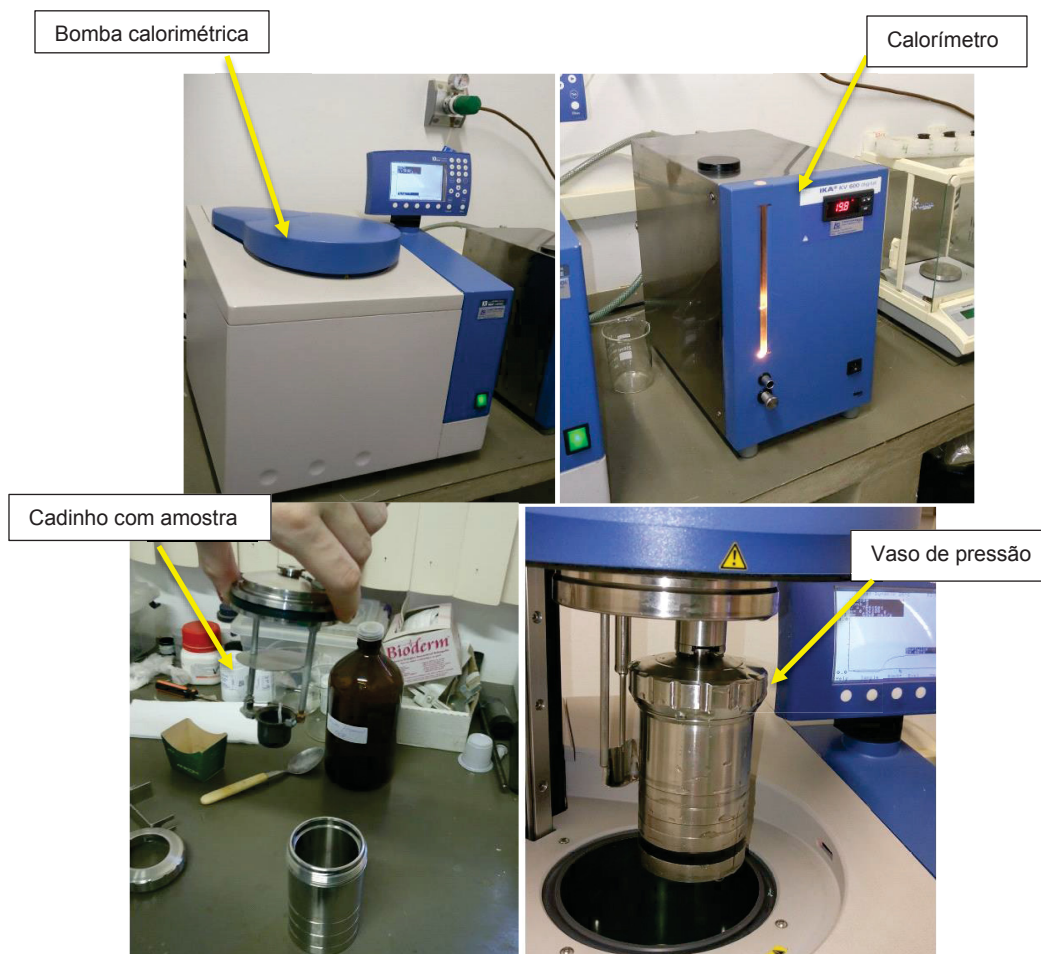
B = peso do cadinho (g)

P = peso da amostra (g)

3.1.10 Determinação de energia bruta ou poder calorífico

Conforme Poli *et al.* (2013), a determinação do poder calorífico é realizada em um conjunto composto por uma bomba calorimétrica e um calorímetro. O procedimento consiste em pesar 3 g da amostra que é colocada em um cadinho montado dentro de um vaso de pressão (bomba calorimétrica) pressurizado com oxigênio puro a cerca de 25 atm, com volume de 350 mL, dotada de um dispositivo de ignição através de corrente elétrica. A seguir, a bomba calorimétrica é instalada dentro do calorímetro, composto por um vaso termicamente isolado do ambiente (adiabático), preenchido com água, dotado de um agitador para homogeneizar a temperatura do conjunto antes da queima e um termômetro de alta precisão para medir o ganho de temperatura. A seguir, um pulso elétrico no dispositivo de ignição causa a combustão da amostra, que eleva a temperatura de todo o conjunto. A partir da elevação da temperatura é apresentado no painel eletrônico o valor do poder calorífico da amostra. A FIGURA 12 apresenta a bomba calorimétrica, calorímetro e painel digital, bem como a posição do cadinho com amostra no vaso de pressão.

FIGURA 12 - VASO DE PRESSÃO (BOMBA CALORIMÉTRICA) E CALORÍMETRO



FONTE: a autora (2017)

3.1.11 Determinação da clorofila a,b e carotenóides totais

O método apresentado por He *et al.* (2015) foi utilizado para determinação da clorofila a,b e carotenóides totais. A clorofila é um pigmento encontrado em todos os grupos de vegetais e outros organismos autótrofos sendo frequentemente utilizada como indicadora da biomassa fitoplanctônica. Os carotenoides totais representam o conjunto de pigmentos contidos na célula tais como luteína, α e β caroteno, xantofilas, entre outros.

Reagentes: etanol 95% p.a.

Materiais: pipeta volumétrica; tubos de ensaio; minipipeta; estante para tubos de ensaio.

Equipamentos: balança analítica; banho-maria com controle de temperatura; freezer; centrífuga e espectrofotômetro.

Procedimento: pesar em torno de 50 mg da amostra e transferir para o tubo de ensaio devidamente identificado, registrar o peso. Adicionar 3 mL de etanol 95%, agitar manualmente e enrolar os tubos em papel alumínio. Em seguida levar ao banho-maria a 60 °C por 40 minutos. Após retirar e levar a freezer a 0 °C por 15 minutos. Retirar e centrifugar as amostras para separação do sobrenadante (6000 rpm, 10 °C, 5 minutos). O sobrenadante é retirado com uma minipipeta (tomando-se o cuidado para não coletar o resíduo, pois pode dificultar a leitura no espectro) e transferido para os frascos de análise do aparelho. Antes de realizar a leitura da absorbância deve-se fazer a leitura do branco, que para este caso é utilizado o etanol 95% e em seguida é realizada a leitura da amostra. As leituras das amostras devem ser realizadas em três comprimentos de onda 665, 649 e 470 nm. A clorofila a, b e carotenóides totais foram obtidos por:

$$Chl_a = 13,95 \times A_{665} - 6,88 \times A_{649} \quad (10)$$

$$Chl_b = 24,96 \times A_{649} - 7,32 \times A_{665} \quad (11)$$

$$Car = \frac{(1000 \times A_{470} - 2,05 \times Chl_a - 114,8 \times Chl_b)}{245} \quad (12)$$

Onde;

Chl_a = clorofila a (mgL⁻¹)

Chl_b = clorofila b (mgL⁻¹)

Car = cartorenóides totais (mgL⁻¹)

A₆₆₅ = valor da absorbância no comprimento de onda 665

A₆₄₉ = valor da absorbância no comprimento de onda 649

A₄₇₀ = valor da absorbância no comprimento de onda 470

3.1.12 Determinação dos lipídeos totais

Os lipídeos são compostos insolúveis em água e as fontes lipídicas são divididas basicamente em duas categorias: óleos e gorduras. Estes elementos são as principais formas de reserva de energia nos organismos vivos, DUARTE (2007, p.13).

- Reagentes: clorofórmio p.a.; metanol p.a.

- Materiais: tubo Falcon 15 ml; pipetas; papel alumínio; pipeta Pasteur.
- Equipamentos: balança analítica; ultrassom; vortex; centrífuga; estufa; dessecador; campana de extração.

Preparação da solução reagente: adicionar 2 partes de clorofórmio para uma parte de metanol.

Preparação de tubo Falcon: manter o tubo em estufa a 60 °C por 30 minutos devidamente identificado como tubo 3, em seguida deixe esfriar em dessecador. Antes de utilizar na devida etapa do ensaio, o mesmo deve ser pesado e o peso registrado.

Procedimento: pesar 50 mg da amostra seca e transferir para o tubo Falcon (tubo 1), adicionar 3 mL da solução reagente e tratar com ultrassom por três ciclos de 15 minutos cada (agitando em vortex no intervalo de cada ciclo). Incubar o tubo 1 em papel alumínio por 24 horas a 4 °C. Em seguida, retirar do freezer e tratar em ultrassom por três ciclos de 15 minutos cada (agitando em vortex no intervalo de cada ciclo), então centrifugar a 5000 rpm, por 5 minutos, a 5 °C. Recuperar o sobrenadante com pipeta Pasteur e transferir outro tubo Falcon (tubo 2), adicionar 1,5 mL da solução reagente à biomassa sedimentada do tubo 1 e centrifugar novamente a 5000 rpm, por 5 minutos, a 5 °C. Recuperar o sobrenadante para o tubo 2, adicionar 2 mL de água destilada e 1 mL de clorofórmio, em seguida agitar e centrifugar novamente a 5000 rpm, por 5 minutos, a 5 °C. Recuperar a fase inferior com pipeta Pasteur e transferir para um tubo 3 (previamente seco e pesado). Lavar a fase aquosa (tubo 2) com 1 mL de clorofórmio, agitar e centrifugar novamente a 5000 rpm, por 5 minutos, a 5 °C, recuperando a fase inferior e transferindo para o tubo 3 e determinar o teor de lipídeos totais pelo método gravimétrico conforme se segue:

$$L_t = \frac{(V_2 - V_1)}{b} \times 100 \quad (13)$$

Onde;

L_t = lipídeos totais (%)

V_1 = massa do tubo 3 com óleo (g)

V_2 = massa do tubo 3 vazio (g)

b = biomassa seca utilizada para extração (g)

3.1.13 Determinação do perfil lipídico

A determinação do perfil lipídico tem como primeira etapa o procedimento de extração, o qual neste estudo foi desenvolvido conforme metodologia de Hartman e Lago (1973). Este procedimento é uma rápida preparação de metil-ésteres para análise de cromatografia gasosa, realizado pela saponificação das gorduras por hidróxido de sódio 0,5 N, seguido de refluxo com uma solução de cloreto de amônio e ácido sulfúrico em metanol.

- Reagentes: hidróxido de sódio p.a.; metanol p.a.; cloreto de amônio p.a.; ácido sulfúrico p.a.; hexano p.a.

- Materiais: balão volumétrico 100 mL; pipetas; *eppendorfs*.

- Equipamentos: agitador mecânico; balança analítica; banho com controle de temperatura; estufa.

Preparação das soluções reagentes:

- Solução de hidróxido 0,5 mol/L: consiste em pesar 0,4 g de hidróxido de sódio, transferir para balão volumétrico e sobre agitador adicionar, aos poucos, 20 mL de metanol.

- Solução esterificante: pesar 0,6666 g de cloreto de amônio, transferir para balaão volumétrico e misturar a 20 mL de metanol e 1 mL de ácido sulfúrico, sob agitação vigorosa por 15 minutos.

Procedimento: pesar, em balança analítica, 0,1 g da biomassa seca e transferir para tubo de ensaio com tampa (o número de tubos é referente ao número de condições e suas triplicatas). Em cada tubo de ensaio é adicionado 1,5 mL da solução de hidróxido e, após tampados, os tubos são colocados em banho a 90 °C por 10 minutos, depois foram retirados e resfriados (podendo utilizar gelo) até temperatura ambiente. A cada tubo foram adicionados 4,5 mL da solução esterificante e, novamente, os tubos são tampados e deixados em banho a 90 °C, desta vez por 5 minutos. Após resfriarem, são adicionados 3,5 mL de hexano em cada tubo e, após agitação, adiciona-se 5,0 mL de água destilada. A separação entre as fases polar e apolar ocorre de forma visível. A fase superior de cada tubo, que é apolar e em teoria contém os óleos já esterificados, é coletada com micropipeta e transferida para *eppendorfs*, previamente pesados e o peso registrado. Os *eppendorfs* são deixados em estufa 50 °C por 24 horas para vaporização do hexano e outros componentes apolares indesejáveis. Quando retirados, os *eppendorfs* devem ser pesados e por

diferença obtem-se as massas finais de cada amostra, valores que devem ser registrados, pois serão necessários nos cálculos de cromatografia gasosa (CG).

3.2 TRATAMENTO MICROBIOLÓGICO

Conforme instrução normativa 4/2007 do MAPA, item 6.1.2, o produtor de ração animal não deve aceitar nenhuma matéria-prima ou ingrediente que contenha parasitas, microrganismos, substâncias tóxicas ou estranhas, que não possam ser reduzidas a níveis aceitáveis na industrialização. O ensaio microbiológico foi aplicado à biomassa seca da microalga *Tetrademus obliquus*, principalmente devido ao processo de cultivo do NPDEAS utilizar também o dejetos suíno biodigerido como fonte de nutrientes.

A análise microbiológica foi realizada utilizando dois métodos para determinação dos microrganismos, o primeiro foi o método Colilert, que é normalmente aplicado em análise de rotina de águas potáveis, de piscinas, costeiras e até residuais. Porém, Oliveira (2013) desenvolveu um estudo sobre a aplicação do método Colilert para alimentos, uma vez que se trata de uma técnica fácil e rápida, apesar de pouco econômica em comparação com os métodos de contagem em placas geralmente utilizados em matrizes de alimentos. O uso do Colilert neste estudo ocorreu devido à disponibilidade do laboratório de hidráulica, do departamento de Engenharia de recursos hídricos e ambiental, em partilhar sua estrutura, sendo este um método aplicado rotineiramente pela equipe técnica do laboratório.

- Reagentes: água peptonada 0,1%; meio de cultura Colilert-18

- Materiais: béquer 250/300 mL; pipetas; bastão de vidro, filtro de papel, erlenmeyer 150/200 mL; placa *tray* com poços múltiplos e molde de borracha (ambos do kit Colilert).

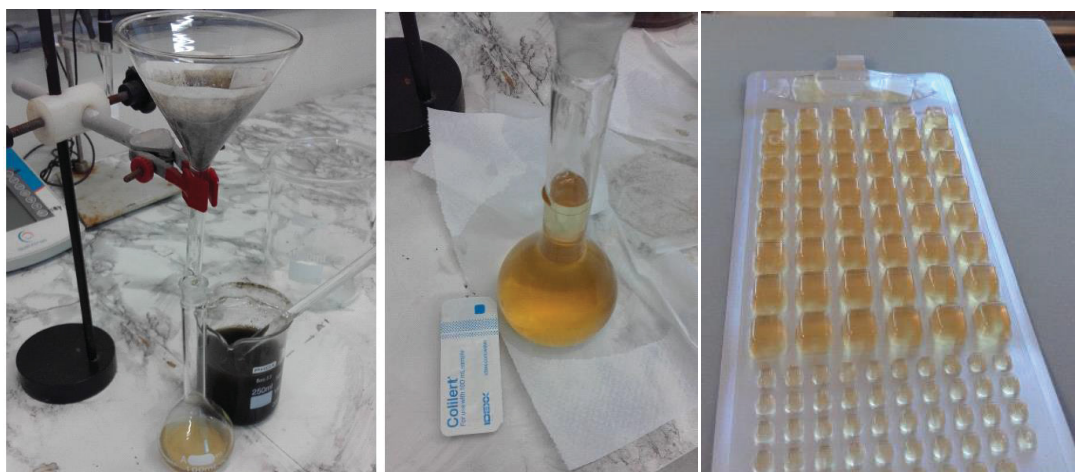
- Equipamentos: Seladora; câmara de luz UV.

Preparo da solução reagente: 25 g de peptona diluída em 250 mL de água destilada.

Preparo da solução mãe: pesar 25 g da biomassa seca (mistura homogênea dos lotes utilizados neste experimento) e adicionar em 250 mL da solução reagente, sendo está a diluição 10^{-1} , outras diluições poderão ser realizadas caso necessário. Agitar por 15 minutos.

Procedimento: foi retirado, com ajuda de pipeta, 100 mL da solução mãe e transferido para erlenmeyer por meio de filtração a vácuo, para eliminação de sólidos suspensos. Em seguida adicionou-se o meio desidratado Colilert-18 (material em pó) aos 100 mL da amostra e agitou-se manualmente até total dissolução. A mistura amostra/reagente permaneceu em repouso até que a espuma desaparecesse. Após segurou-se com a mão uma placa *tray* com poços múltiplos, na posição vertical e com a superfície dos poros voltados para a palma da mão, apertou-se a parte lateral superior da placa para abertura e inserção da amostra. A FIGURA 13 apresenta as etapas de filtração, adição do meio desidratado e placa *tray* preenchida com a amostra.

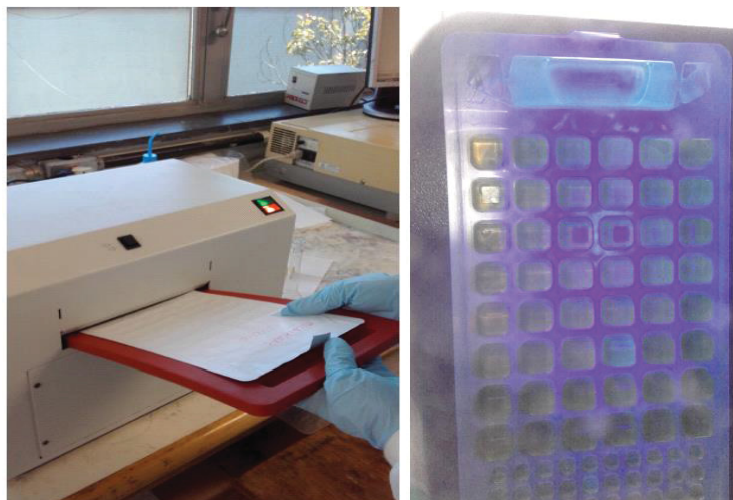
FIGURA 13 - FILTRAÇÃO, MEIO DE CULTURA E PLACA TRAY



FONTE: a autora (2017)

A placa preenchida com a amostra foi então posicionada em um molde de borracha e selada a quente, com o lado dos poços virado para baixo, conforme mostrado na FIGURA 14. Após a selagem a placa foi colocada em estufa para incubar a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, durante 18 horas. Após o período de incubação, a placa é colocada em câmara UV para verificação de coloração dos poços, que quando apresentam fluorescência são tidos como positivos para presença de coliformes e *E. coli*. A FIGURA 14 apresenta estas etapas do processo.

FIGURA 14 - SELAGEM NO MOLDE E LEITURA UV



FONTE: a autora (2017)

O método Colilert indicou a presença de coliformes. Sendo assim, foi necessário realizar o processo de autoclave das amostras de biomassa seca para redução e/ou eliminação dos microrganismos. As amostras foram submetidas à autoclave a 125 °C por 30 minutos, conforme RIBEIRO (2006). A FIGURA 15 apresenta o processo de autoclave e temperatura.

FIGURA 15 - PROCESSO DE AUTOCLAVE



FONTE: a autora (2017)

O segundo método para análise microbiológica foi realizado, após autoclave, no laboratório do departamento da Engenharia de alimentos e consiste na leitura de placas com o meio de cultivo próprio para cada espécie a ser determinada, conforme

Oliveira (2013). Neste caso então a amostra suspeita é inoculada nas placas e incubada em estufa para crescimento da colônia. A FIGURA 16 apresenta as placas inoculadas.

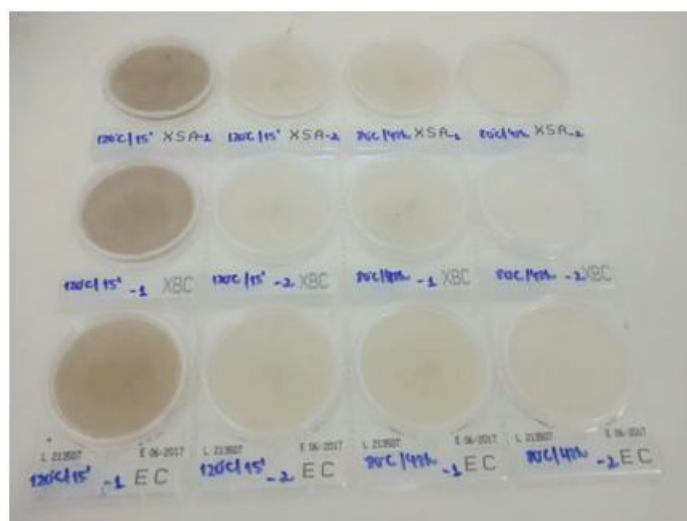
- Reagentes: água peptonada 0,1%

Materiais: erlenmeyer; pipetas; bastão de vidro; difusor plástico; kit de placas *Compact Dry* (Nissui Pharmaceutical, 2013).

Equipamentos: estufa; leitor de placas.

Procedimento: a amostra, diluída ou não, é inoculada na superfície do filme base e o filme superior é sobreposto, com o auxílio de um difusor plástico a amostra é espalhada numa área delimitada. Após solidificação da substância gelificante, a placa é incubada e deixada em estufa por 24 horas a 35 °C. O aparecimento da cor da colônia de *E. coli* é azul a azul-arroxeadado, sendo as colônias vermelhas e rosas características de coliformes.

FIGURA 16 - PLACAS INOCULADAS APÓS INCUBAÇÃO



FONTE: a autora (2017)

Conforme o documento Normas e padrões de nutrição e alimentação animal (2000) do MAPA, a TABELA 2 apresenta as especificações de nível microbiológico para rações.

TABELA 2 – NORMAS MICROBIOLÓGICAS PARA RAÇÕES

Ração	Bom	Aceitável	Inaceitável
I – Extrusada			
Microrganismo (total/g)	$< 10^5$	10^6 a 10^7	$> 10^8$
Fungos/g	< 10	10^3 a 10^4	$> 10^5$
E. coli em 0,1 g	Ausente	Presente	Presente
Salmonella em 25 g	Ausente	Ausente	Presente
II – Peletizada			
Microrganismo (total/g)	$< 10^6$	10^6 a 10^7	$> 10^8$
Fungos/g	$< 10^3$	10^3 a 10^4	$> 10^5$
E. coli em 0,1 g	Ausente	Presente	Presente
Salmonella em 25 g	Ausente	Ausente	Presente

FONTE: Normas e padrões de nutrição e alimentação animal – TABELA I32 (2000).

3.3 CARACTERIZAÇÃO DA RAÇÃO SUPLEMENTADA

A ração com adição da biomassa de microalga será avaliada quanto a composição química referente às características, FÉLIX (2011):

- Matéria seca;
- Proteína bruta;
- Extrato etéreo – hidrólise ácida;
- Fibra bruta;
- Matéria mineral;
- Cálcio;
- Fósforo total;
- Extratos não nitrogenados;
- Energia metabolizável.

Os ensaios listados utilizam os mesmos procedimentos aplicados à caracterização da biomassa de microalga.

3.4 ANÁLISE TERMoeCONÔMICA

A análise termoeconômica foi realizada com base num modelo simples de fluxo da produção de ração animal, conforme FIGURA 17, e teve como objetivo a

análise do custo energético e exergético além do impacto referente a inclusão da dosagem de biomassa. Os cálculos da contabilidade exergética foram realizados com base na análise de volumes de controle, BEJAN (1996, p. 124). A equação para o cálculo da variação da exergia no volume de controle, e que apresenta as propriedades extensivas das correntes de fluxo (massa, energia, entropia, exergia, etc) que entram e saem de um volume de controle é dada por:

$$\frac{dE_{VC}}{dt} = \sum_j \left(1 - \frac{T_0}{T_j}\right) \dot{Q}_j - \left(\dot{W}_{VC} - p_0 \frac{dV_{VC}}{dt}\right) + \sum_i \dot{m}_i e_i - \sum_e \dot{m}_e e_e - \dot{E}_D \quad (14)$$

Onde;

dE_{VC}/dt = taxa de variação da exergia em relação ao tempo (kJh^{-1})

T_0 = temperatura inicial de referência (K)

T_j = temperatura no volume de controle (K)

\dot{Q}_j = taxa de calor transferido (kJh^{-1})

\dot{W}_{VC} = taxa de energia transferida em forma de trabalho (kJh^{-1})

p_0 = pressão inicial de referência (bar)

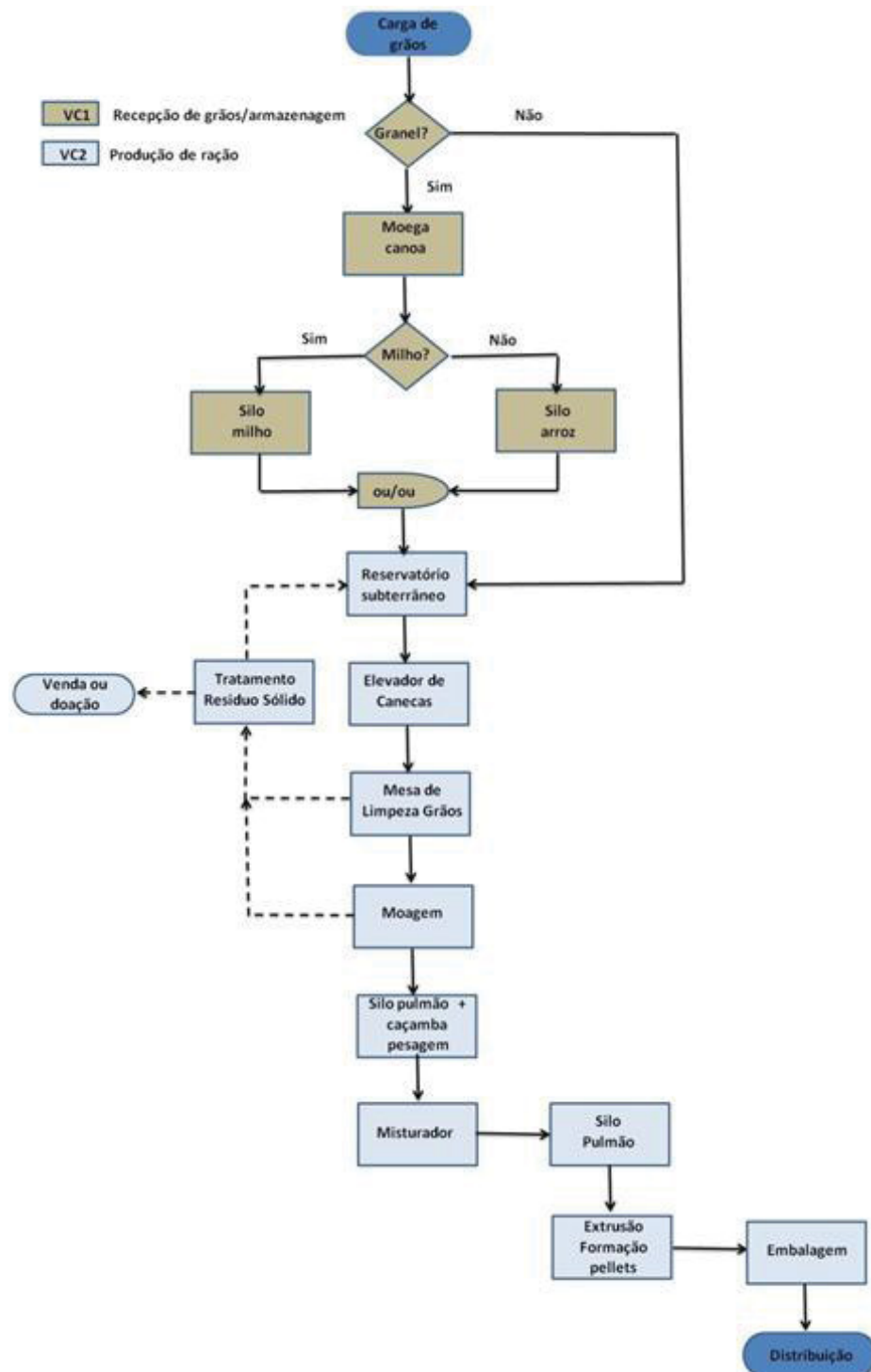
dV_{VC}/dt = taxa de mudança de volume no tempo (m^3h^{-1})

$\dot{m}_i e_i$ = fluxo mássico de entrada da exergia (kJh^{-1})

$\dot{m}_e e_e$ = fluxo mássico de saída da exergia (kJh^{-1})

\dot{E}_D = taxa de exergia destruída (kJh^{-1})

FIGURA 17 - FLUXO PROC. INDUSTRIAL DE PRODUÇÃO DA RAÇÃO



FONTE: a autora (2017)

Considerando que os volumes de controle estejam no estado estacionário a forma estável para o saldo de exergia nos volumes de controle considera que $dE_{vc}/dt = 0$ e $dV_{vc}/dt = 0$. Portanto a EQUAÇÃO 14 pode ser simplificada da seguinte maneira:

$$\dot{E}_D = \sum_j \dot{E}_{q,j} - \dot{W}_{VC} + \sum_i \dot{E}_i - \sum_e \dot{E}_e \quad (15)$$

Onde;

\dot{E}_D = taxa de exergia destruída (kJh⁻¹)

$\sum_j \dot{E}_{q,j}$ = somatório da exergia referente ao calor transferido (kJh⁻¹)

$\sum_i \dot{E}_i$ = somatório da exergia na entrada (kJh⁻¹)

$\sum_e \dot{E}_e$ = somatório da exergia na saída (kJh⁻¹)

Como os fluxos da fábrica de ração são sólidos (grãos, farinhas, etc), foi utilizado, conforme Boyar (2012), a exergia para fluido incompressível dada pela EQUAÇÃO 16.

$$\dot{E}_{IC} = c_i \cdot \left(T - T_0 - T_0 \ln \frac{T}{T_0} \right) \cdot \dot{m}_i \quad (16)$$

Onde;

\dot{E}_{IC} = fluxo de exergia de fluido incompressível (kJh⁻¹)

c_i = calor específico da substância i (Jkg⁻¹ K⁻¹)

\dot{m}_i = vazão mássica da substância i (kg h⁻¹)

T = temperatura local atual (K)

T₀ = temperatura inicial de referência (K)

A eficiência exergética de cada estágio do processo foi calculada conforme BEJAN (1996, p.150).

$$\varepsilon = 1 - \frac{\dot{E}_D + \dot{E}_L}{\dot{E}_f} \quad (17)$$

Onde:

ε = eficiência exergética (%)

\dot{E}_D = taxa de exergia destruída (kJ/h)

\dot{E}_L = taxa de exergia perdida (kJ/h)

\dot{E}_f = taxa de exergia na entrada (kJ/h)

Nos cálculos para dimensionamento de equipamentos e determinação do atrito com as paredes considerou-se as equações descritas em SILVA *et al.* (2008, cap.12, p. 280-308) e SCALABRIN (2008, p. 47-49). O dimensionamento dos transportadores helicoidais foi realizado considerando as variações de comprimento e inclinação ao longo da planta, conforme segue:

$$Q_{nom} = 4,71 \cdot 10^{-5} \cdot (D - d^2) \cdot p \cdot N \quad (18)$$

Onde;

Q_{nom} = capacidade nominal ($m^3/min.$)

D = diâmetro do helicóide (cm)

d = diâmetro do eixo do helicóide (cm)

p = passo do helicóide (cm)

N = número de rotações (rpm)

$$P_{req} = 2,22 \cdot 10^{-4} (Q \cdot Me \cdot L \cdot Fm) \quad (19)$$

Onde;

P_{req} = potência requerida (cv)

Q = capacidade ($m^3/min.$)

Me = massa específica do material (kg/m^3)

L = comprimento do helicóide

Fm = fator de potência (depende do material) adimensional

A TABELA 3 apresenta valores dos fatores de potência e massa específica para alguns produtos.

A inclinação dos transportadores helicoidais reduz a capacidade de transporte, segundo Silva *et al.* (2008), sendo assim para ângulo de 15° a redução é de aproximadamente 30% e ângulos de 25 a 30° redução em torno de 55%. A TABELA 4 apresenta os fatores de correção para as potências requeridas.

Produto	Dens. (kg/m ³)	Fator de potência
Cevada	609	0,4
Soja	800	0,5
Milho	720	0,4
Aveia	416	0,4
Arroz	769	0,4
Trigo	770	0,4
Farelo	250	0,4

FONTE: Silva *et al.* (2008, cap.12, p. 283).

TABELA 4 – FATORES DE CORREÇÃO - POTÊNCIA DO TRANSP. HELICOIDAL.

Potência (cv)	Fator correção
Menor que 1,0	2,00
De 1,0 a 2,0	1,50
De 2,0 a 4,0	1,25
Maior que 5,0	Sem correção

FONTE: Silva *et al.* (2008, cap.12, p. 284).

O cálculo da energia perdida pelo atrito com as paredes foi realizado com auxílio da teoria de Janssen descrita por Scalabrin (2008, p. 47). Esta teoria é composta por equações que determinam as pressões que ocorrem em paredes e fundos de silos conforme listado abaixo:

$$P_V = \gamma \cdot Z_0 \cdot \left(1 - e^{\frac{-Z}{Z_0}}\right) \quad (20)$$

Onde;

P_V = pressão vertical (kN/m²)

γ = peso específico aparente do material (kN/m³)

Z_0 = altura inicial (m)

Z = profundidade (m)

$$P_H = K_S \cdot P_V \quad (21)$$

Onde;

P_H = pressão horizontal (kN/m²)

K_S = razão entre a pressão horizontal e vertical (adimensional)

$$P_W = \mu \cdot P_H \quad (22)$$

Onde;

P_W = pressão na parede (kN/m²)

μ = coeficiente de atrito do grão com a superfície da estrutura (adimensional)

$$P_F = \mu \cdot (P_V \cdot \cos^2(\alpha) + P_H \cdot \sin^2(\alpha)) \quad (23)$$

Onde;

P_F = pressão no fundo do silo (kN/m²)

α = ângulo de inclinação do cone de fundo do silo

Scalabrin (2008, p. 51) apresenta ainda os valores estimados para o coeficiente de atrito (μ), a razão entre pressão horizontal e vertical (K_S) para alguns tipos de materiais que constituem a estrutura do silo. A TABELA 5 lista os valores que foram calculados em um limite superior de pressão devido à carga de grãos.

TABELA 5 – PROPRIEDADES DO MATERIAL DE FABRICAÇÃO DO SILO

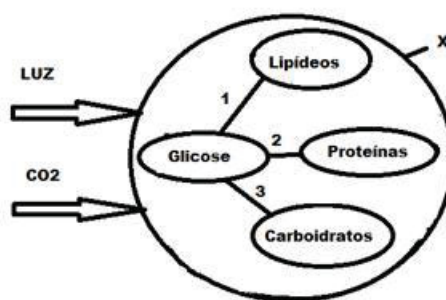
Material	μ	K_S
Aço	0,30	0,50
Concreto	0,40	0,50
Aço corrugado	0,37	0,50

FONTE: Scalabrin (2008).

3.5 ELABORAÇÃO DO MODELO MATEMÁTICO

O modelo matemático dinâmico, proposto neste estudo e publicado em Lírio *et al* (2018), foi elaborado com base no balanço de massa intra e extracelular, visando quantificar as concentrações de biomassa, lipídeos, proteínas e carboidratos obtidas a partir do cultivo da microalga *Tetrademus obliquus*, em escala laboratorial, com condições controladas e uso do meio de cultivo sintético. A FIGURA 18 apresenta, de forma resumida, a representação dos fluxos considerados para elaboração do modelo.

FIGURA 18 - REPRES. ESQUEMÁTICA DOS FLUXOS CELULARES



FONTE: Modificado de Mairet *et al* (2011).

Os fluxos de transferência 1, 2 e 3 serão considerados como enzimas responsáveis pela transformação da glicose ($C_6H_{12}O_6$) em lipídeos, proteínas e carboidratos. Estas enzimas são inerentes ao organismo celular da microalga e funcionam como agentes motivadores das reações de transformação sobre diferentes condições de cultivo. O valor nutricional da biomassa pode variar de acordo com as condições de cultivo, sendo assim, mantendo a incidência de luz e temperatura constante foi possível obter um conjunto de equações diferenciais representativas das taxas de fluxo de entrada e saída, considerando as mesmas condições para os meios intra e extracelular.

A biomassa, representada por x na FIGURA 18, é considerada como a soma das concentrações de lipídeos, proteínas e carboidratos. A equação cinética para representar a taxa de crescimento da biomassa foi baseada na equação de Haldane (Bekirogullari *et al*, 2017), porém acrescida com os efeitos inibidores das altas

concentrações de CO₂ e intensidade da luz (considerada constante neste experimento), como se segue:

$$\mu_{Foto} = \mu_{max} \left(\frac{I (L)}{K_{SI} + I (L) + \frac{(I (L))^2}{K_{II}}} \right) \left(\frac{[CO_2]}{K_{SCO_2} + [CO_2] + \frac{[CO_2]^2}{K_{ICO_2}}} \right) \quad (24)$$

Onde;

μ_{max} = taxa específica máxima de crescimento (dia⁻¹)

I = fator de incidência da luz (Lux)

K_{SI} = coeficiente de saturação da luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

K_{II} = coeficiente de inibição da luz ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

$[CO_2]$ = concentração de CO₂ (mol L⁻¹)

K_{SCO_2} = coeficiente de saturação da concentração de CO₂ ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

K_{ICO_2} = coeficiente de inibição da concentração de CO₂ ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

μ_{Foto} = taxa específica de crescimento (dia⁻¹)

As taxas de acumulação lipídica, protéica e de carboidratos são dadas por:

$$\mu_{Lip} = q_{Lipmax} \left(\frac{[C_6H_{12}O_6]}{K_{SLip} + [C_6H_{12}O_6]} \right) \quad (25)$$

$$\mu_{Carb} = q_{Carbmax} \left(\frac{[C_6H_{12}O_6]}{K_{SCarb} + [C_6H_{12}O_6]} \right) \quad (26)$$

$$\mu_{Prot} = q_{Protmax} \left(\frac{[C_6H_{12}O_6]}{K_{SProt} + [C_6H_{12}O_6]} \right) \left(\frac{[NH_3]}{K_{SNH_3} + [NH_3]} \right) \quad (27)$$

Onde;

q_{Lipmax} ; $q_{Carbmax}$; $q_{Protmax}$ = taxas máximas de acumulação da concentração de lipídeos, carboidratos e proteínas (g g⁻¹)

K_{sLip} ; K_{sCarb} ; K_{sProt} = constantes de saturação da concentração de lipídeos, carboidratos e proteínas ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

$[C_6H_{12}O_6]$ = concentração de glicose (mg L^{-1})

$[NH_3]$ = concentração de amônia (mg L^{-1})

O conjunto de equações diferenciais ordinárias (EDOs) desenvolvidas com base no balanço de massa na célula e na lei da conservação da massa representam a taxa de consumo de gás carbônico, glicose e amônia, bem como as taxas de produção de biomassa, lipídeos, proteínas e carboidratos. O consumo de CO_2 é calculado por:

$$\frac{d_{CO_2}}{dt} = CO_2^{in} - \left(1,5\mu_{Foto} \frac{y_{CO_2}}{y_{C_6H_{12}O_6}} \right) X \quad (28)$$

Onde;

CO_2^{in} = concentração de entrada do gás carbônico (mg L^{-1})

y_{CO_2} = massa molecular do gás carbônico (g)

$y_{C_6H_{12}O_6}$ = massa molecular da glicose (g)

X = concentração de biomassa (mg L^{-1})

Lembrando que o meio é diluído, então parte da concentração de gás carbônico na entrada do sistema é diluída e outra parte (que neste caso foi desprezada devido ao seu baixo valor) retorna ao ambiente. A FIGURA 19 mostra este processo.

Sendo assim, o fluxo de gás carbônico na entrada foi calculado com base no processo de transferência de massa como se segue:

$$CO_2^{in} = KLa_{CO_2} (C_{CO_2}^* - C_{CO_2}) \quad (29)$$

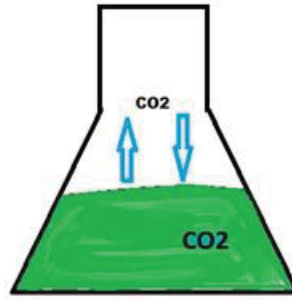
Onde;

KLa_{CO_2} = coeficiente de transferência de massa (adimensional)

$C_{CO_2}^*$ = concentração de gás carbônico diluída (mg L^{-1})

C_{CO_2} = concentração de gás carbônico no ar de entrada (mg L^{-1})

FIGURA 19 - FLUXO DE GÁS CARBÔNICO NO MEIO DE CULTIVO



FONTE: a autora (2018)

Para determinação da concentração de gás carbônico diluída foi utilizada a lei de Henry, conforme se segue:

$$C_{CO_2}^* = H_{CO_2} P_{CO_2}^0 \quad (30)$$

Onde;

H_{CO_2} = constante de Henry para o gás carbônico em função da temperatura

$P_{CO_2}^0$ = pressão parcial do gás carbônico (atm)

As taxas de produção de lipídeos, carboidratos e proteínas são calculadas por:

$$\frac{d[Lip]}{dt} = \mu_{Lip} \frac{y_{Lip}}{y_{C_6H_{12}O_6}} X \quad (31)$$

$$\frac{d[Carb]}{dt} = \mu_{Carb} \frac{y_{Carb}}{y_{C_6H_{12}O_6}} X \quad (32)$$

$$\frac{d[Prot]}{dt} = \mu_{Prot} \frac{y_{Prot}}{y_{C_6H_{12}O_6}} X \quad (33)$$

Onde;

μ_{Lip} ; μ_{Carb} ; μ_{Prot} = taxas de acumulação ($g\ g^{-1}$)

y_{Lip} ; y_{Carb} ; y_{Prot} = massas molares de lipídeos, carboidratos e proteínas (g)

$y_{C_6H_{12}O_6}$ = massa molar da glicose (g)

X = concentração de biomassa (mg L^{-1})

As taxas de consumo da glicose e amônia, além da produção da biomassa são calculadas por:

$$\frac{dC_{6H_{12}O_6}}{dt} = (\mu_{Foto} - \mu_{Lip} - \mu_{Carb} - \mu_{Prot})X \quad (34)$$

$$\frac{dNH_3}{dt} = -\mu_{Prot}Y_{NH_3}X \quad (35)$$

$$\frac{d[X]}{dt} = (\mu_{Lip} + \mu_{Carb} + \mu_{Prot}Y_{Prot})Y_XX \quad (36)$$

Onde;

μ_{Lip} ; μ_{Carb} ; μ_{Prot} = taxas de acumulação (g g^{-1})

μ_{Foto} = taxa específica de crescimento (dia^{-1})

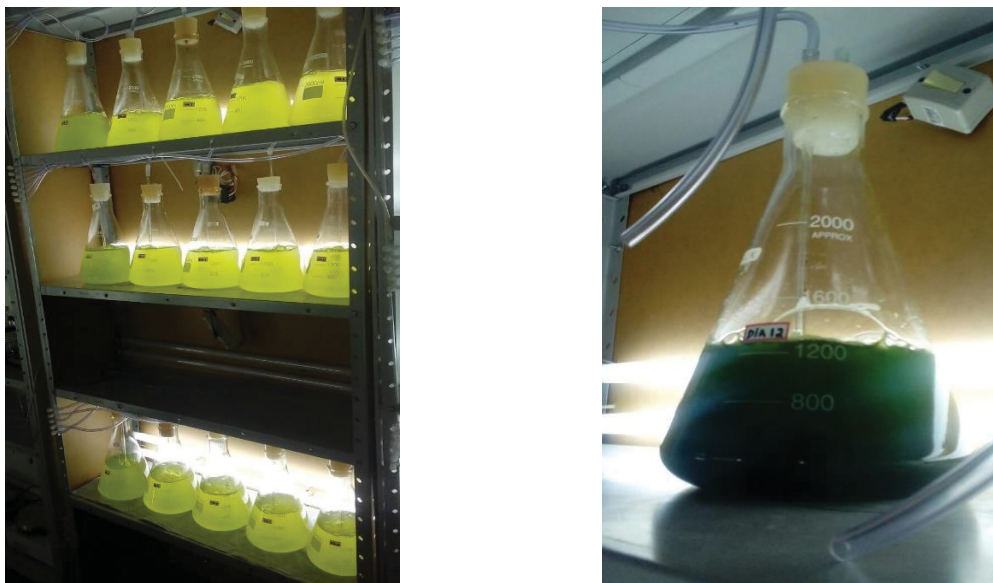
Y_{NH_3} ; Y_X ; Y_{Prot} = massas molares da amônia, biomassa e proteínas (g)

X = concentração de biomassa (mg L^{-1})

3.6 MEIO DE CULTIVO – CRESCIMENTO

O inóculo foi cultivado em escala laboratorial utilizando 15 erleymeyers, contendo o meio CHU modificado (Santos, 2016) num volume de 1,6 L. A temperatura, luminosidade e vazão do ar foram mantidas constantes, sendo 22 ± 2 °C, 720 a 760 Lux e aproximadamente $1,5 \text{ L min}^{-1}$. O meio foi inoculado com 200 cel mL^{-1} e as coletas, para análise, foram realizadas a cada 3 dias durante um período de 15 dias de acompanhamento. A FIGURA 20 apresenta o arranjo experimental dentro da sala de cultivo e o detalhe na inclusão da corrente de ar dentro do erleymeyer.

FIGURA 20 - ARRANJO EXPERIMENTAL DO CULTIVO EM LABORATÓRIO



FONTE: a autora (2018)

3.7 OBTENÇÃO DOS DADOS EXPERIMENTAIS

Os dados experimentais foram obtidos por meio da avaliação das amostras coletadas do cultivo. A cada 3 dias de coleta, as amostras foram analisadas quanto ao pH, contagem de células, recuperação da biomassa pelo processo de filtração após adição do agente floculante e posterior secagem da mesma, a 70 °C durante 48 horas. A biomassa seca foi então moída e armazenada em congelador a aproximadamente 4 °C para posterior determinação de lipídeos, proteínas e carboidratos conforme metodologias referenciadas na TABELA 1.

3.8 VALIDAÇÃO DO MODELO

O modelo foi validado pela comparação com os resultados obtidos por meio dos gráficos das corridas experimentais. O modelo foi simulado em Matlab (versão 2017) para solução de um sistema de equações diferenciais utilizando os parâmetros e variáveis definidos na TABELA 6.

TABELA 6– PARÂMETROS DE MODELAGEM

Parâmetro	Valor	Parâmetro	Valor
I (Lux)	700	K_{iCO_2} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	0,16821798
H_{CO_2} ($\text{mol L}^{-1}\text{atm}^{-1}$)	0,034	q_{Lipmax} (g g^{-1})	0,01021636
$P_{CO_2}^0$ (atm)	0,0004	K_{sLip} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	0,00050150
y_{Prot} (g)	1,25	$q_{Carbmax}$ (g g^{-1})	0,87461420
y_{NH_3} (g)	0,25	K_{sCarb} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	0,44153024
μ_{max} (dia^{-1})	7,64082733	$q_{Protmax}$ (g g^{-1})	0,03317236
K_{sI} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	1,21631808	K_{sProt} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	0,00000005
K_{iI} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	6,11618045	K_{sNH_3} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	0,00000018
K_{sCO_2} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	0,00000012	Kla_{CO_2} ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	2,95789911
y_X (g)	1,51820871		

FONTE: Lirio *et al.* (2018)

3.9 ENSAIO COM OS CÃES

Os ensaios foram realizados com um grupo de 16 cães da raça Beagle (8 fêmeas e 8 machos), pertencentes ao Laboratório de Estudos de Nutrição Canina - LENUCAN, com peso médio de 12 kg e idade 2 anos, vacinados e desverminados. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), do setor de ciências agrárias da UFPR, sobre o protocolo 082/2017. O experimento foi desenvolvido no período de 32 dias, sendo 25 dias de adaptação, 5 dias para coleta das amostras biológicas e 2 dias para o ensaio de palatabilidade (AAFCO, 2004). Os cães foram pesados no início e final do período experimental.

O total de ração utilizado no experimento foi 130 kg, sendo que para o teste de palatabilidade foi fornecida uma quantidade 30% superior à porção diária calculada. Nas dietas foi utilizada uma ração cuja composição química dos principais elementos está apresentada na TABELA 7. A biomassa seca, após pesagem, foi adicionada sobre os grãos de ração e misturada manualmente, de forma a aderir na superfície dos grãos facilitando a sua ingestão pelo animal, conforme mostra a FIGURA 21.

TABELA 7– CARACTERÍSTICAS NUTRICIONAIS DA RAÇÃO

Característica	%	g/kg
Proteína Bruta	20	200
Extrato etéreo	7	70
Matéria fibrosa	4	40
Matéria mineral	10	100
Cálcio (min.)	0,8	8
Cálcio (máx.)	2,2	22
Fósforo (min.)	0,8	8
Umidade	9	90
Sódio	0,3	3

FONTE: a autora (2017).

FIGURA 21 - PESAGEM DA BIOMASSA E ADIÇÃO NA RAÇÃO



FONTE: a autora (2017)

As quantidades da ração fornecidas aos animais foram calculadas de forma a atender as necessidades de energia metabolizável (NEM, kcal/d), calculada de acordo com a NRC (2006) como se segue:

$$NEM = 130.PC.0,75 \quad (25)$$

Onde;

NEM = necessidade energética de manutenção (kcal/g)

PC = peso corporal do animal (g)

Os animais foram divididos em dois grupos: um grupo controle formado por 8 cães (4 fêmeas e 4 machos) e o grupo tratamento também com 8 cães (4 fêmeas e 4 machos). O grupo controle não recebeu ração com adição de biomassa e o grupo tratamento recebeu a dieta com dosagem de 5% de biomassa seca sobre ração. Portanto, para o período total de experimento foram utilizados 3,29 kg de biomassa seca. A dosagem de 5% foi escolhida com base em estudos anteriores onde se utilizou porcentagem de 3% a 5% de linhaça para composição das dietas (BAUER, 2008).

Durante o período de adaptação os animais foram mantidos na rotina normal do canil, a qual consiste em:

- Limpeza e manutenção de água fresca, uma vez ao dia, durante todo o período do experimento. Água fornecida à vontade;
- Alimentação as 08:30 da manhã;
- Mantidos presos nas baias 12 cães, porém efetuado rodízio de 4 cães por dia que permaneciam soltos até o dia seguinte quando eram soltos mais 4 cães (todos do mesmo sexo para evitar brigas). Esta operação de manejo tem o objetivo de minimizar o estresse dos animais.

A FIGURA 22 mostra parte da estrutura do LENUCAN e as baias (4,7 m de comprimento x 2,22 m de largura) que são compostas por um tapete de borracha, bebedouro com água fresca e uma área coberta. A água é fornecida à vontade e caso qualquer animal não consuma no mínimo 70% da dieta ofertada ou apresentar qualquer efeito adverso, como vômito ou diarreia, o estudo é interrompido imediatamente e outra dieta comercial é fornecida. Os cães machos são separados das fêmeas para evitar brigas ou reprodução durante período de cio. Em cada baia são alojadas duplas do mesmo sexo que, durante a fase de adaptação, foram presas individualmente somente para alimentação.

Para o ensaio de palatabilidade os cães foram alimentados uma única vez ao dia, com a quantidade de ração fornecida superior a 30% às necessidades de EM, durante dois dias, sendo quantificados o volume fornecido e as sobras. A palatabilidade foi determinada por meio da mensuração da preferência alimentar e primeira escolha entre as rações ofertadas aos cães e mensuradas comparando-se as dietas em pares (GRIFFIN, 2003).

FIGURA 22 - APRESENTAÇÃO DO CANIL E ALOJAMENTO (BAIAS)



FONTE: a autora (2017)

A digestibilidade foi verificada por meio do cálculo do coeficiente de digestibilidade (CD), o qual indica a proporção de alimento ingerido que realmente é digerida e absorvida pelo organismo, Case *et al.* (1995). A coleta das fezes foi realizada durante os dias 25 a 30 de experimento. Neste período de 5 dias os animais foram mantidos presos individualmente e alimentados duas vezes ao dia. O coeficiente de digestibilidade aparente é calculado por (FÉLIX, 2009).

$$CDA (\%) = \frac{Nutr(I) - Nutr(E)}{Nutr(I)} 100 \quad (26)$$

Onde;

Nutr(I) = nutriente ingerido (g)

Nutr(E) = nutriente excretado (g)

3.10 COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

As fezes foram coletadas uma vez ao dia no primeiro horário da manhã, pesadas, identificadas por período/animal e armazenadas em freezer (- 4 °C). No final do experimento, as mesmas foram descongeladas, homogeneizadas e secas em estufa de ventilação forçada de 55°C a 60 °C durante 48 horas até peso constante. A FIGURA 23 mostra as fezes armazenadas em recipientes identificados, refrigeradas e a secagem delas para posterior análise.

Além das fezes também foram realizadas coletas de amostras sanguíneas de todos os animais no dia 30 (antes do ensaio de palatabilidade). O procedimento foi realizado no jejum às 08:00 da manhã, com participação de médico veterinário, sendo os animais alimentados logo após o término da coleta.

FIGURA 23 - ARMAZENAGEM, REFRIGERAÇÃO E SECAGEM DAS FEZES



FONTE: a autora (2017)

3.10.1 Análise das amostras biológicas

As fezes secas e as dietas foram moídas e analisadas, no laboratório de nutrição animal da UFPR, para determinação dos teores de matéria seca (MS) à 105°C por 12 horas, proteína bruta (PB), fibra bruta (FB), extrato etéreo em hidrólise ácida (EEA), matéria mineral (MM), umidade, cálcio e fósforo, segundo CBAA (2009). A análise de fibra dietética será realizada de acordo com PROSKY et al. (1992). A

energia bruta (EB) foi determinada em bomba calorimétrica (Parr Instrument Co. model 1261, Moline, IL, USA). A energia metabolizável (EM) foi estimada e a fração correspondente aos extrativos não nitrogenados (ENN) calculada segundo FÉLIX (2009), conforme se segue:

$$EM (kcal g^{-1}) = \frac{\{EB(I) - EB(E) - [(PB(I) - PB(E))1,25]\}}{R(I)} \quad (27)$$

Onde;

EB(I) = energia bruta ingerida (kcal g⁻¹)

EB(E) = energia bruta excretada nas fezes (kcal g⁻¹)

PB(I) = proteína bruta ingerida (g)

PB(E) = proteína bruta excretada nas fezes (g)

R(I) = ração ingerida (g)

$$ENN(\%) = 100 - (MM\% + PB\% + EE\% + FB\%) \quad (28)$$

Onde;

MM = porcentagem de matéria mineral (%)

PB = porcentagem de proteína bruta (%)

EE = porcentagem de extrato etéreo (%)

FB = porcentagem de fibra bruta (%)

O escore fecal não foi avaliado neste experimento, porém no acompanhamento de limpeza diária do canil foi possível verificar algumas características das fezes quando da comparação entre grupo controle e tratamento. As amostras de sangue foram analisadas quanto ao perfil bioquímico, eritograma e Leucograma. As análises das amostras foram realizadas no laboratório clínico do Hospital Veterinário UFPR (Agrárias).

3.11 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

A análise de incertezas experimentais permite quantificar as incertezas intrínsecas aos processos experimentais. Neste estudo, para os dados referentes a

caracterização da biomassa, o limite de precisão foi computado como sendo o dobro do desvio padrão das referidas medições, com grau de confiança de 95%, assumindo que a população segue uma distribuição normal, ASME (KIM; SIMON, 1993). Todas as outras amostras tiveram seus dados submetidos ao teste de Levenson para verificar a homogeneização das variâncias e, quando significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, ou seja, num intervalo de confiança de 95%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados estão apresentados na sequência em que foram realizados, sendo primeiro referente à caracterização da biomassa da microalga, seguido pela caracterização da ração, caracterização das fezes, análise da digestibilidade, palatabilidade, análise das amostras de sangue e peso corporal.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA DA MICROALGA

As análises quanto às propriedades nutricionais da biomassa seca apresentaram resultados interessantes em relação a proteínas, lipídeos, entre outros. A TABELA 8 apresenta os valores por lote da biomassa, sendo possível verificar a existência de alta concentração de proteína, fibras, lipídeos, extrato etéreo e minerais com destaque para o fósforo. Resultados semelhantes foram descritos na literatura por Santos (2016). A biomassa possui ainda alto valor energético conforme resultado da energia bruta, fator importante para a conversão do substrato em energia pelo animal (Zaine et al., 2014).

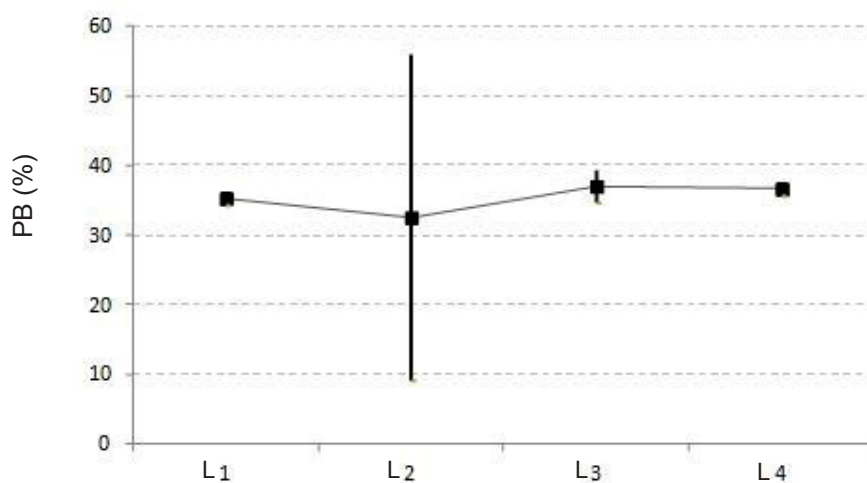
TABELA 8– PROPRIEDADES DA BIOMASSA

Propriedade	Unidade	LOTES				Média	Desvio P
		14/12/2016	26/12/2016	08/10/2015	06/10/2015		
Umidade	%	3,53	4,23	5,22	5,19	4,71	0,704
Proteína bruta	%	35,30	31,77	37,42	36,66	35,98	6,894
Extrato Etéreo	%	12,24	13,12	10,96	10,19	11,60	1,702
Resíduo mineral	%	8,95	9,06	7,59	8,74	8,85	0,550
Fibra bruta	%	3,20	3,79	3,05	3,83	3,50	0,161
FDA	%	27,32	32,74	33,42	27,84	30,29	10,208
FDN	%	47,34	58,95	63,77	52,67	55,81	51,607
Cálcio	%	0,60	0,57	0,68	0,63	0,62	0,002
Fósforo	%	1,68	1,47	0,62	0,48	1,05	0,361
Sódio	%	0,03	0,07	0,16	0,16	0,12	0,004
Potássio	%	0,40	0,36	0,25	0,28	0,32	0,005
Lípidos totais	%	11,32	12,20	11,28	12,77	11,76	0,544
Energia bruta	kcal/kg	5483,00	5423	5455	5523	5469,00	1808

FONTE: a autora (2017)

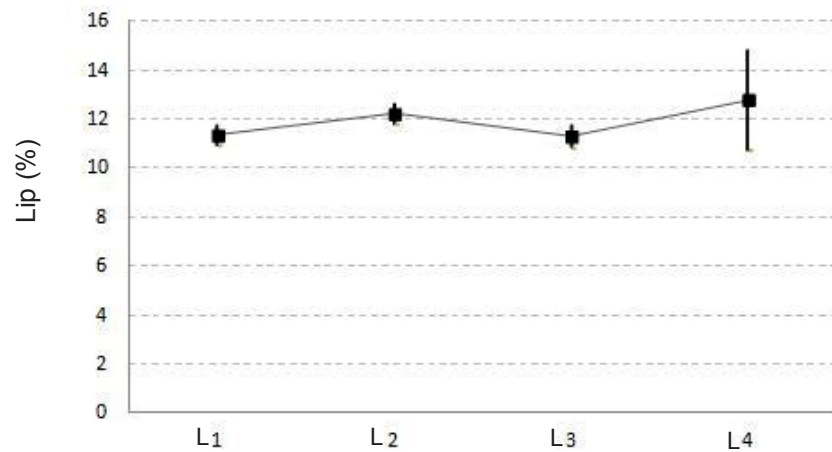
Desta forma, os valores que apresentaram maiores desvios entre lotes foram referentes às análises de proteína bruta, fibras FDA e FDN, extrato etéreo e energia bruta. O que pode ser, além de outros motivos intrínsecos aos experimentos, devido a grande variabilidade de situações produtivas nas bateladas (meio de cultivo, secagem, tempo de armazenagem, etc). Os GRÁFICOS 1 e 2 apresentam o intervalo de variação dos dados obtidos, referentes as propriedades proteína bruta e lipídeos totais, pelo número de lotes, onde lote 1 tem data de 14/12/2016; lote 2 (26/12/2016); lote 3 (08/10/2015) e lote 4 (06/10/2015).

GRÁFICO 1 – PROTEÍNA BRUTA



FONTE: a autora (2017)

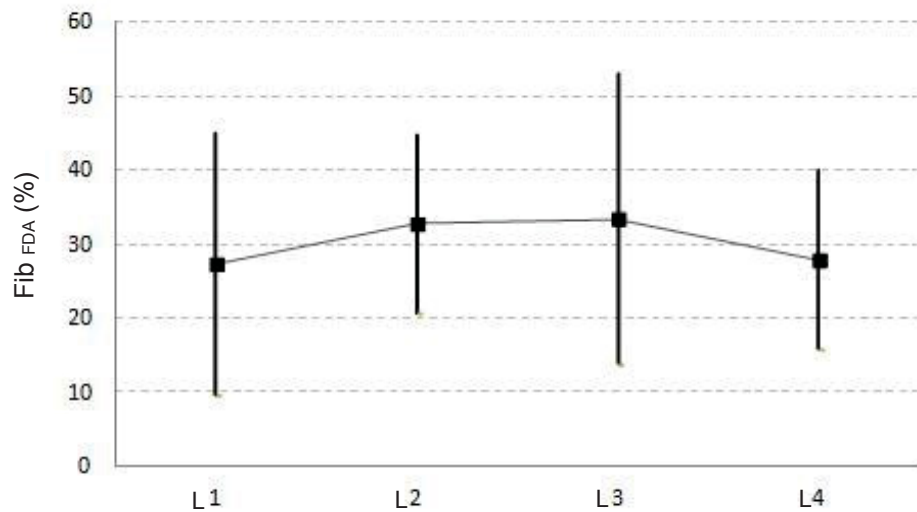
GRÁFICO 2 – LIPÍDEOS TOTAIS



FONTE: a autora (2017)

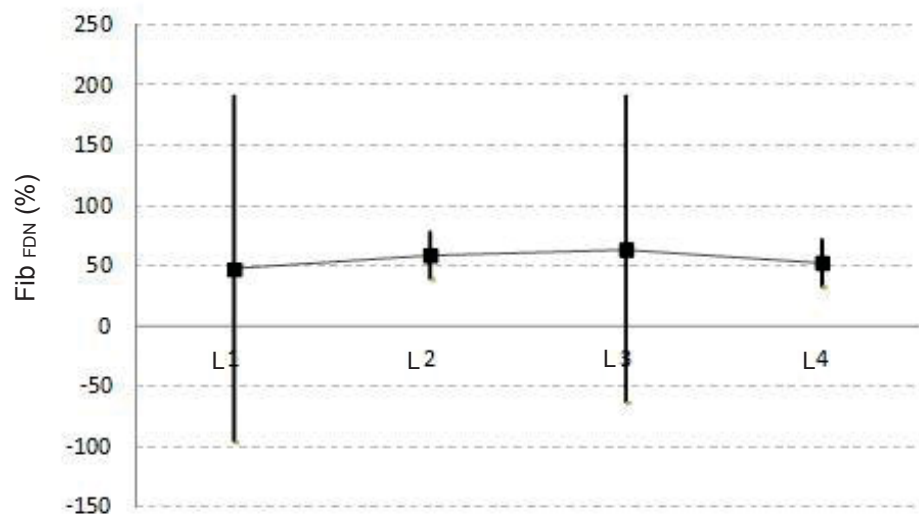
Foram observados que ambos os gráficos apresentam maiores desvios em apenas um dos pontos mensurados. A análise das fibras FDA e FDN apresentaram os maiores intervalos de variância, conforme mostram os GRÁFICOS 3 e 4.

GRÁFICO 3 – FIBRA FDA



FONTE: a autora (2017)

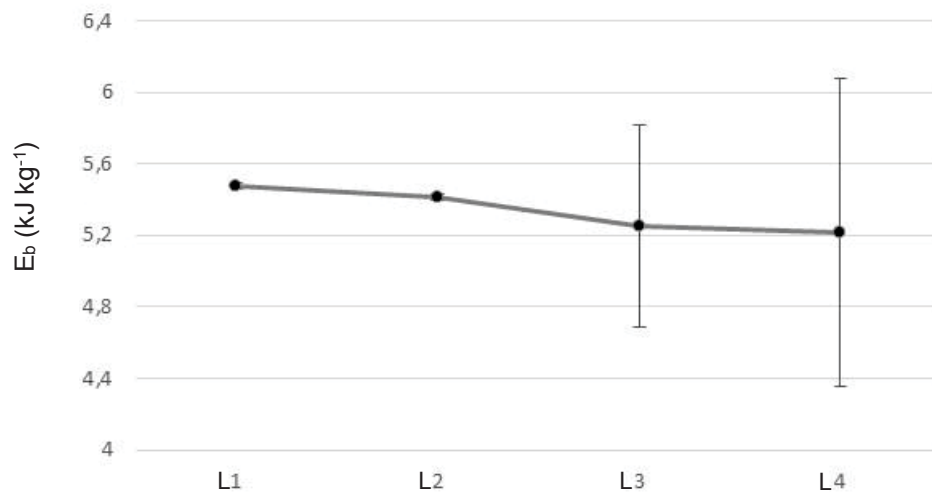
GRÁFICO 4 – FIBRA FDN



FONTE: a autora (2017)

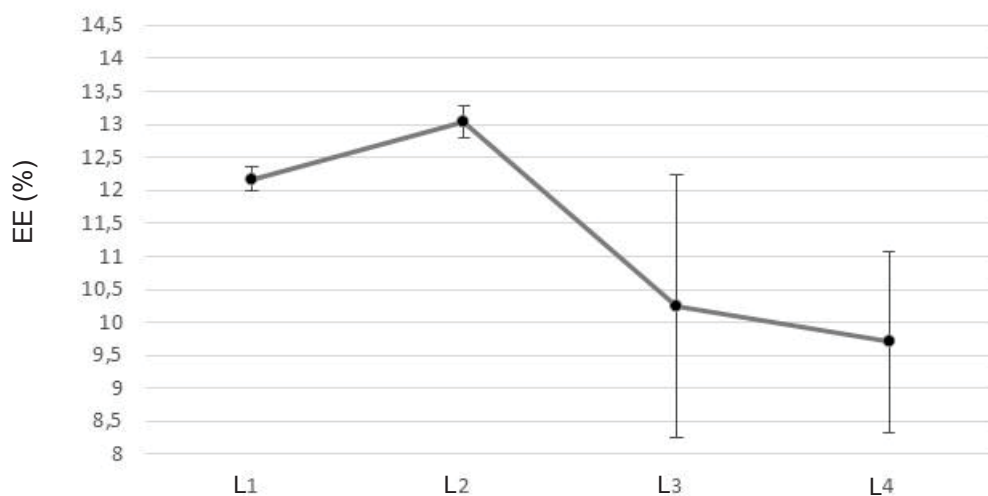
Os valores para energia bruta (kJ/kg) e extrato etéreo apresentaram maior variação nos lotes 3 e 4 que são os mais antigos, conforme mostram os GRÁFICOS 5 e 6.

GRÁFICO 5 – ENERGIA BRUTA



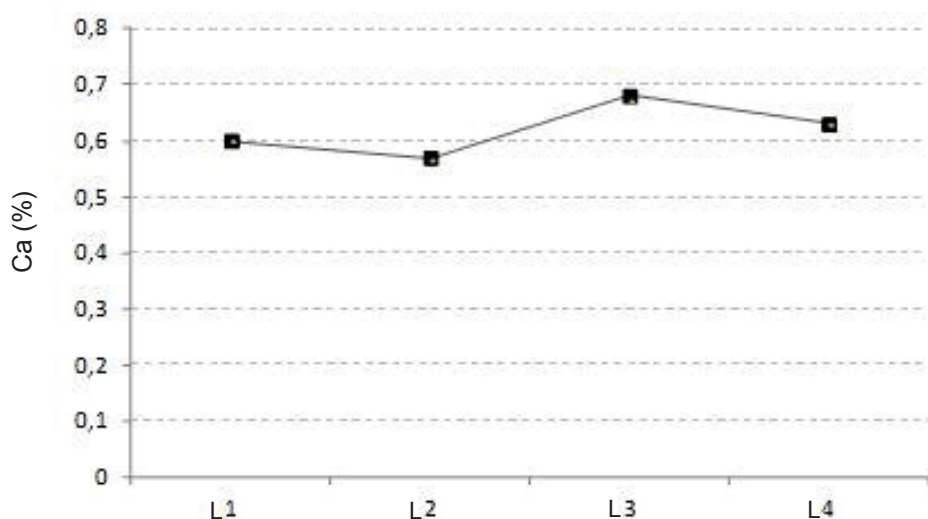
FONTE: a autora (2017)

GRÁFICO 6 – EXTRATO ETÉREO



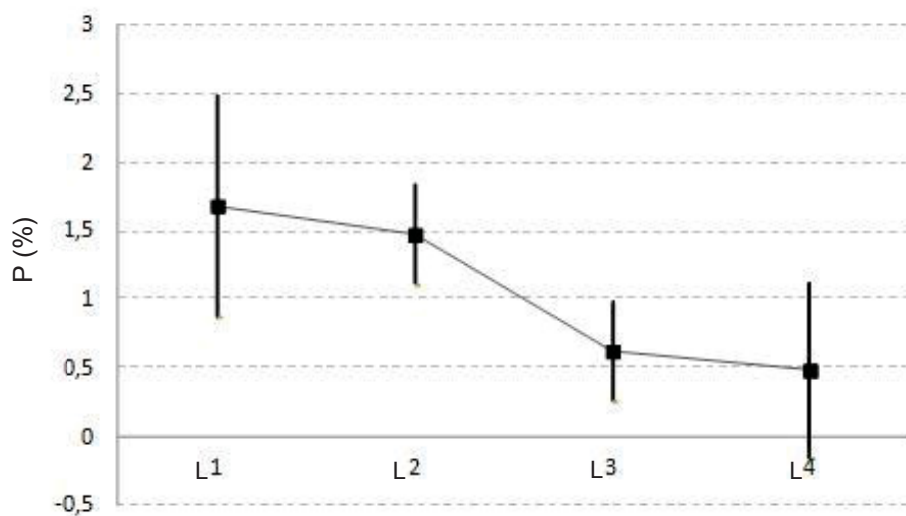
As análises dos sais minerais cálcio, potássio e sódio apresentaram menor variância experimental entre os lotes analisados. Porém, maior variância entre lotes foi observada nos resultados de fósforo sendo possível verificar uma redução da concentração para os lotes mais antigos (3 e 4), fato percebido também com a concentração de potássio. Os GRÁFICOS 7,8,9 e 10 mostram os resultados obtidos.

GRÁFICO 7 – CÁLCIO



FONTE: a autora (2017)

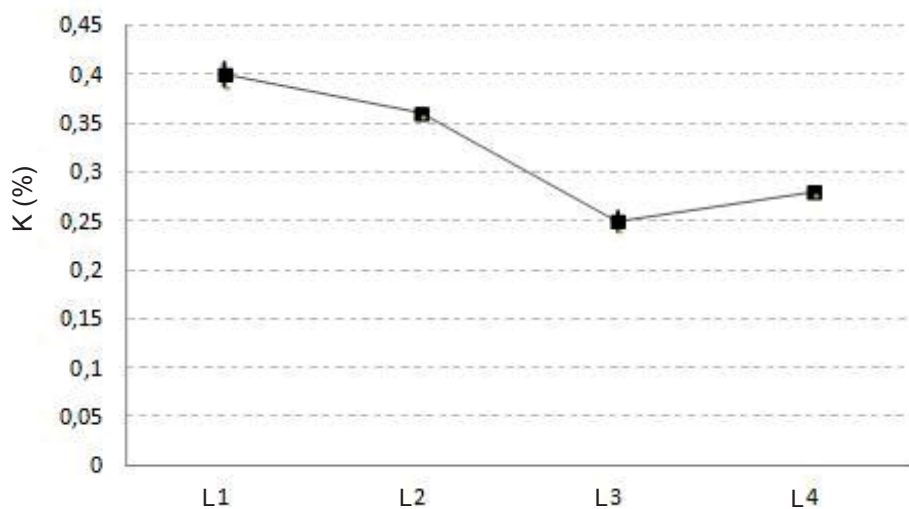
GRÁFICO 8 – FÓSFORO



FONTE: a autora (2017)

No GRÁFICO 10 os resultados mostraram um aumento na concentração de sódio para os lotes mais antigos (3 e 4).

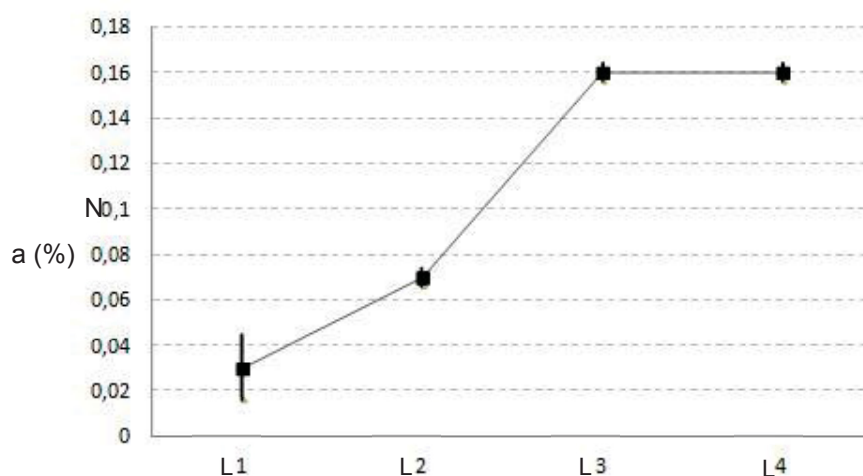
GRÁFICO 9 – POTÁSSIO



FONTE: a autora (2017)

No GRÁFICO 9 é possível verificar o aumento na concentração de sódio nos lotes 3 e 4 que apresentam datas de produção mais antigas.

GRÁFICO 10 – SÓDIO



FONTE: a autora (2017)

4.1.1 Determinação do perfil lipídico

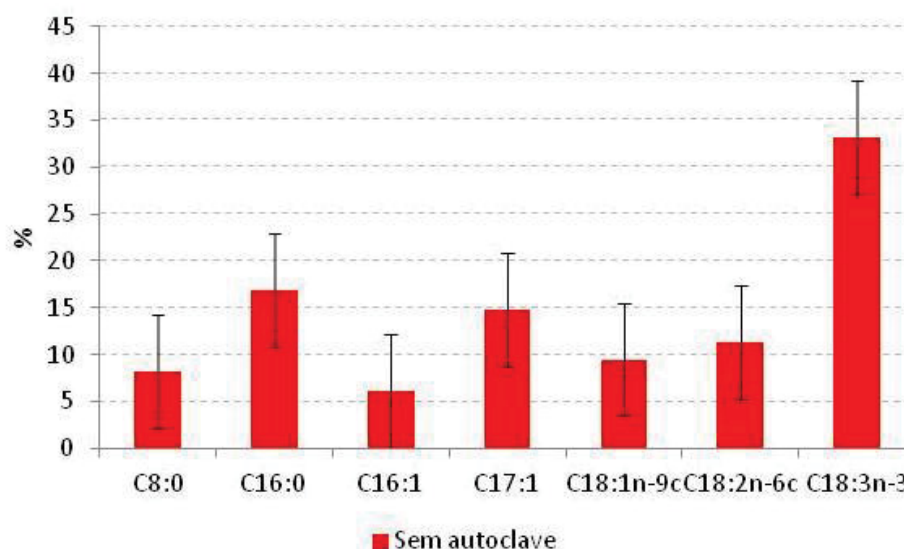
Após extração da fração lipídica por Hartman e Lago (1973) as amostras foram enviadas para análise de cromatografia CG-MS. Os ensaios foram realizados em duas etapas, na primeira etapa não foi realizada a operação de autoclave para redução e/ou eliminação microbiológica. Os resultados obtidos na primeira análise (as amostras foram analisadas em triplicata) estão resumidos na TABELA 9 e apresentados no GRÁFICO 11 considerando o intervalo do desvio.

TABELA 9– PERFILLIPIDICO: SEM AUTOCLAVE

Elemento	%	DP
C8:0	8,266	6,04
C16:0	16,865	6,04
C16:1	6,124	6,04
C17:1	14,769	6,04
C18:1n-9c	9,487	6,04
C18:2n-6c	11,353	6,04
C18:3n-3	33,135	6,04

FONTE: a autora (2017)

GRÁFICO 11 – PERFIL LIPÍDICO: SEM AUTOCLAVE



FONTE: a autora (2017)

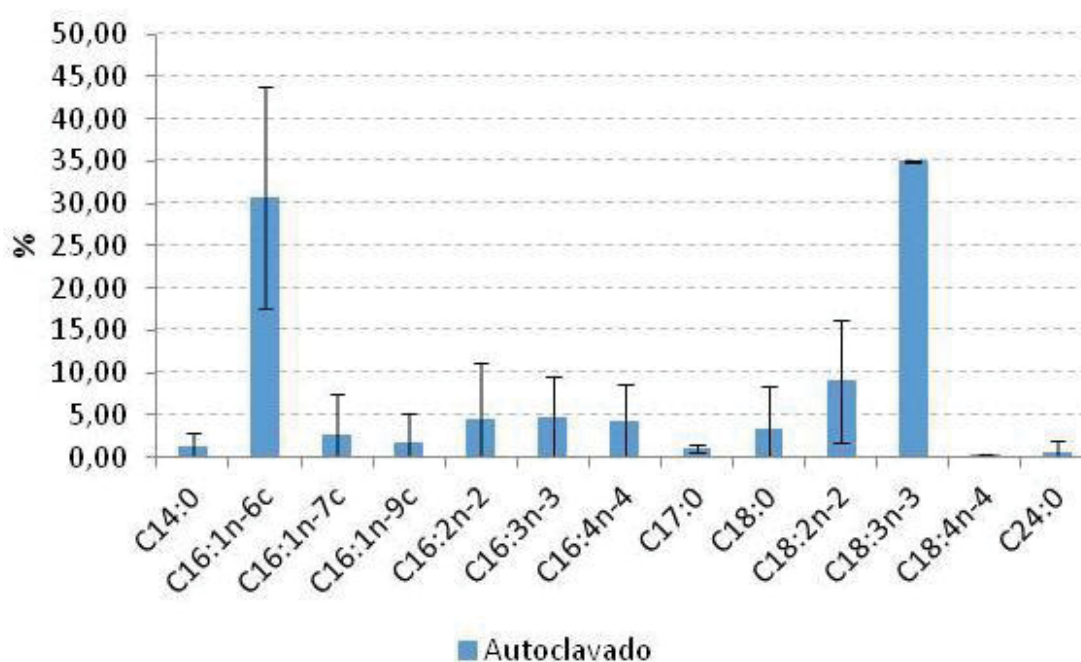
A segunda corrida experimental foi realizada com as amostras após autoclave para verificar se ocorreram perdas em termos de elementos essenciais, tais como ácidos graxos pertencentes ao grupo ômega – 3, principalmente em relação ao ácido alfa-linolênico, sendo este um ácido essencial de cadeia curta (C18:3n-3) de origem vegetal quando ingerido, pode ser convertido em EPA e DHA pelas enzimas presentes no organismo do animal (Mueller et al, 2004). A TABELA 10 e o GRÁFICO 12 mostram os valores obtidos para os possíveis elementos presentes nas amostras (análises realizadas em triplicata), porém neste ensaio não foi injetado padrão para referência, utilizou-se a biblioteca NIST do software YL Clarity MS que contém cerca de 37 elementos.

TABELA 10– PERFILLIPÍDICO: APÓS AUTOCLAVE

Elemento	%	DP
C14:0	1,40	1,44
C16:1n-6c	30,83	13,11
C16:1n-7c	2,67	4,83
C16:1n-9c	1,80	3,42
C16:2n-2	4,50	6,74
C16:3n-3	4,83	4,65
C16:4n-4	4,30	4,33
C17:0	1,10	0,40
C18:0	3,37	5,16
C18:2n-2	9,03	7,26
C18:3n-3	35,03	0,12
C18:4n-4	0,33	0,12
C24:0	0,70	1,31

FONTE: a autora (2017)

GRÁFICO 12 – PERFIL LIPÍDICO: APÓS AUTOCLAVE



FONTE: a autora (2017)

O comparativo entre os perfis lipídicos, antes e após autoclave, mostra que não houve perda significativa do ácido graxo essencial ALA (C18:3n-3), elemento de interesse para esta pesquisa.

4.2 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Os resultados da análise microbiológica para biomassa da microalga *Tetrademus obliquus* utilizada neste estudo foram medidos antes e após tratamento térmico em estufa por 48 horas. No entanto, os microrganismos termoresistentes ainda permaneceram acima do nível permitido, então foi necessário realizar um tratamento térmico mais rigoroso por meio de autoclave por 30 minutos. A TABELA 11 apresenta os valores resultantes da análise microbiológica.

O tratamento microbiológico por meio do uso de autoclave e posterior contagem de microrganismos, presentes nas placas de Petri, mostrou ausência de *E. Coli* e *Salmonella*, responsáveis por patogenicidades em animais (Megid et al., 2001), indicando que a biomassa utilizada é apropriada para consumo dos cachorros.

TABELA 11– RESULTADOS DE ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Microrganismo	UFC/g
I – Biomassa seca	
E. coli	4,04.10 ⁶
Salmonella	1.10 ⁵

II – Biom. Estufa 80°C por 48h	
E. coli	1,2.10 ¹
Salmonella	Ausente

III – Autoclave	
E. coli	Ausente
Salmonella	Ausente

FONTE: a autora (2017)

4.3 CARACTERIZAÇÃO DA RAÇÃO

As rações com e sem adição de biomassa foram analisadas, no Laboratório de Nutrição Animal (Labzoo), quanto as suas propriedades. Na TABELA 12 estão listados os resultados obtidos no ensaio, sendo que as médias situadas na mesma linha, com índice de letras iguais, não apresentam diferença significativa (teste Tukey,

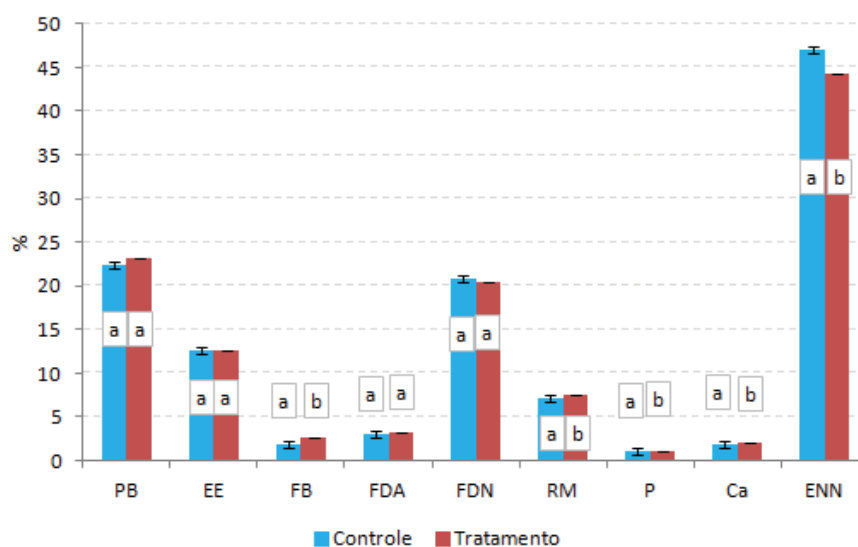
$p \leq 0,05$). O GRÁFICO 13 apresenta o comparativo entre as dietas controle e tratamento.

TABELA 12– COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS DIETAS

(% na matéria seca)	Controle	5% Biomassa	CV (%)
Proteína Bruta	22,47±0,49 ^a	23,15±0,28 ^a	4,01
Extrato etéreo	12,65±0,03 ^a	12,55±0,22 ^a	2,15
Fibra bruta	1,88±0,07 ^a	2,64±0,01 ^b	3,81
Fibra FDA	2,97±0,03 ^a	3,29±0,17 ^a	6,61
Fibra FDN	20,87±0,30 ^a	20,44±0,54 ^a	3,67
Matéria mineral	7,06±0,00 ^a	7,57±0,00 ^b	0,08
Fósforo	1,02±0,00 ^a	1,04±0,00 ^b	0,56
Cálcio	1,80±0,01 ^a	2,09±0,00 ^b	0,59
ENN	47,10±0,38 ^a	44,33±0,03 ^b	1,03
Energia bruta (kcal g ⁻¹)	4,22	4,59	
Energia metabolizável (kcal/g)	3,45±0,01 ^a	3,50±0,02 ^a	0,80

*CV = coeficiente de variação FONTE: a autora (2017)

GRÁFICO 13 – COMPARATIVO ENTRE ÀS PROPRIEDADES DAS DIETAS



FONTE: a autora (2018)

No GRÁFICO 13 as colunas com mesma letra não apresentam diferença significativa entre as médias (Tukey, $p \leq 0,05$). Portanto, a ração tratamento (5% de biomassa de microalga) apresentou concentração em fibra bruta de 2,64 sobre matéria seca, valor 40% maior em relação a dieta controle. A concentração de matéria mineral foi de 7,57 e 2,09 de cálcio, no entanto, o percentual de extrativos não nitrogenados (ENN) foi de 44,33 que é 6% menor em relação a dieta controle. Os

extrativos não nitrogenados representam os carboidratos de mais fácil digestão, como os açúcares e o amido (ALVES *et al.*; 2008).

4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS FEZES

As fezes foram analisadas, após secagem e moagem, com relação às características químicas. No entanto, houve a perda de duas amostras durante o processamento sendo uma do grupo controle e outra do grupo tratamento. A TABELA 13 contém os valores das propriedades químicas das fezes, sendo que as médias situadas na mesma linha, com índice de letras iguais, não apresentam diferença significativa (teste Tukey, $p \leq 0,05$). Os resultados são mais bem visualizados no GRÁFICO 14 onde colunas com mesma letra não apresentam diferença significativa.

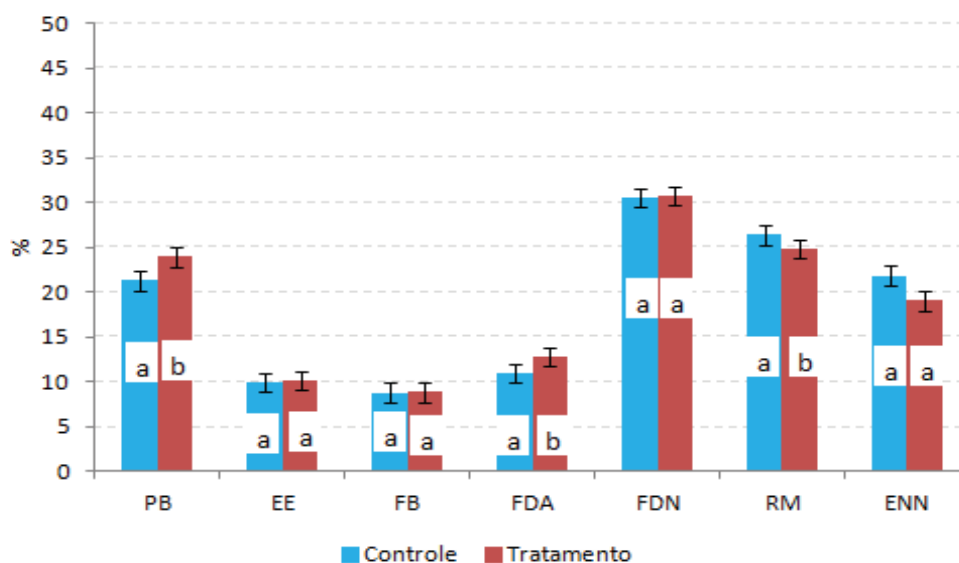
TABELA 13– COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FEZES

(% na matéria seca)	Controle	5% Biomassa	CV (%)
Proteína Bruta	21,29±0,39 ^a	23,91±0,29 ^b	5,70
Extrato etéreo	9,88±0,14 ^a	10,13±0,12 ^a	4,82
Fibra bruta	8,76±0,21 ^a	8,79±0,27 ^a	10,29
Fibra FDA	10,89±0,34 ^a	12,79±0,24 ^b	9,40
Fibra FDN	30,50±0,99 ^a	30,75±0,62 ^a	10,07
Matéria mineral	26,37±0,54 ^a	24,85±0,43 ^b	7,10
ENN	21,83±1,07 ^a	19,02±1,05 ^a	19,37
Energia bruta (kcal g ⁻¹)	3,11±0,14 ^a	3,40±0,09 ^a	9,60

*CV = coeficiente de variação

FONTE: a autora (2018)

GRÁFICO 14 – COMPARATIVO ENTRE ÀS PROPRIEDADES DAS FEZES



FONTE: a autora (2018)

No GRÁFICO 14 observa-se que as fezes do grupo tratamento apresentam maior quantidade de fibra FDA e proteína bruta sendo 12,79 e 23,9 sobre matéria seca, porém menor percentual de resíduo mineral e extrato não nitrogenado sendo 24,85 e 19,02. O fato da proteína bruta estar presente em maior percentual nas fezes do grupo tratamento pode significar maior dificuldade de absorção da proteína provinda de fonte de origem vegetal (Pires et al., 2006). A melhor digestibilidade dos resíduos minerais é um benefício para a saúde do animal. A fibra FDA é basicamente lignina e celulose, portanto pouco digerível para cães e gatos, porém pode favorecer a formação das fezes dependendo do tipo e quantidade (Pinto, 2007).

Neste experimento não foi realizado o escore diário para avaliar a qualidade aparente das fezes, porém foi verificado durante a limpeza das baias que as fezes dos animais pertencentes ao grupo tratamento apresentaram melhor formação e consistência, enquanto as fezes do grupo do controle, em sua maioria, apresentaram-se pastosas e com má formação. Os graus de escore são definidos como: 1 – fezes pastosas e sem forma; 2 – fezes macias, mal formadas e que assumem o formato do recipiente de coleta; 3 – fezes macias, formadas e úmidas, que marcam o piso; 4 – fezes bem formadas e consistentes que não aderem ao piso e 5 – fezes bem formadas, duras e secas, FÉLIX (2009). As FIGURAS 24 e 25 mostram o comparativo entre as características visuais das fezes coletadas referente ao grupo controle e tratamento.

FIGURA 24 - QUALIDADE APARENTE DAS FEZES: GRUPO CONTROLE



FONTE: a autora (2017)

FIGURA 25 - QUALIDADE APARENTE DAS FEZES: GRUPO TRATAMENTO



FONTE: a autora (2017)

4.5 ANÁLISE DA DIGESTIBILIDADE

Os cães consumiram as dietas ofertadas e não apresentaram problemas como episódios de vômito ou outros sintomas de adoecimento. O coeficiente de digestibilidade aparente (CDA) das dietas controle e tratamento (5% de biomassa), além da energia metabolizável são apresentados na TABELA 14, sendo que as médias situadas na mesma linha, com índice de letras iguais, não apresentam diferença significativa (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

TABELA 14– COEF. DE DIGESTIBILIDADE APARENTE E ENERGIA METABOLIZÁVEL

Variáveis	CDA		
	Controle	5% Biomassa	CV (%)
Matéria seca	97,58±0,10 ^a	96,97±0,23 ^a	0,32
Matéria orgânica	97,71±0,16 ^a	97,04±0,29 ^a	0,42
Proteína bruta	97,06±0,19 ^a	96,39±0,34 ^a	0,49
Extrato etéreo	97,03±0,19 ^a	96,33±0,33 ^a	0,48
Energia metabolizável (kcal g ⁻¹)	3,20±0,01 ^a	3,56±0,01 ^b	0,41

*CV = coeficiente de variação FONTE: a autora (2018)

Os valores dos coeficientes de digestibilidade não apresentaram diferença estatística, mantendo-se elevados com a adição da biomassa de microalgas, porém a energia metabolizável apresentou valor de 3,56 kcal g⁻¹, o qual é 11% maior em relação a dieta controle, podendo significar que os cães tiveram bom aproveitamento da energia dos ingredientes ingeridos (Carciofi, 2008).

4.6 ANÁLISE DA PALATABILIDADE

A palatabilidade foi avaliada, durante 2 dias, pelo número de primeira visita aos potes e pela razão de ingestão (RI) entre as dietas controle e tratamento. A TABELA 15 mostra os valores obtidos quanto à preferência alimentar considerando o comparativo entre os maiores valores de ingestão e os menores valores de ingestão para as duas dietas. As médias situadas na mesma linha, com índice de letras iguais, não apresentam diferença significativa (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

TABELA 15– RESULTADOS QUANTO À PREFERÊNCIA ALIMENTAR

	Controle	5% Biomassa	CV (%)
RI (%) – maior fração ingerida	36,57±2,50 ^a	50,50±1,70 ^b	17,00
RI (%) – menor fração ingerida	11,74±0,69 ^a	18,34±0,90 ^b	18,54
Primeira visita ao pote	12	20	

*CV = coeficiente de variação

FONTE: a autora (2018)

Os resultados obtidos mostraram que a maior fração de ingestão foi da ração com 5% de biomassa sendo de 50,5 (aproximadamente 38% maior em relação a dieta controle), bem como a primeira escolha ou visita ao pote foi observada em um número de vezes maior em relação a dieta tratamento.

4.7 ANÁLISE DO PESO CORPORAL E AMOSTRAS DE SANGUE

4.7.1 Comparativo do peso corporal antes e após experimento

Os animais foram pesados no início e final do experimento e foi constatado ganho de peso pelo grupo controle enquanto para o grupo tratamento, com adição de 5% de biomassa, não houve diferença significativa referente ao peso médio. A TABELA 16 lista os valores medidos e apresenta o comparativo entre o grupo controle e tratamento, sendo que as médias situadas na mesma linha, com índice de letras iguais, não apresentam diferença significativa (teste Tukey, $p \leq 0,05$). As médias obtidas foram também comparadas por sexo, dentro do mesmo grupo de animais.

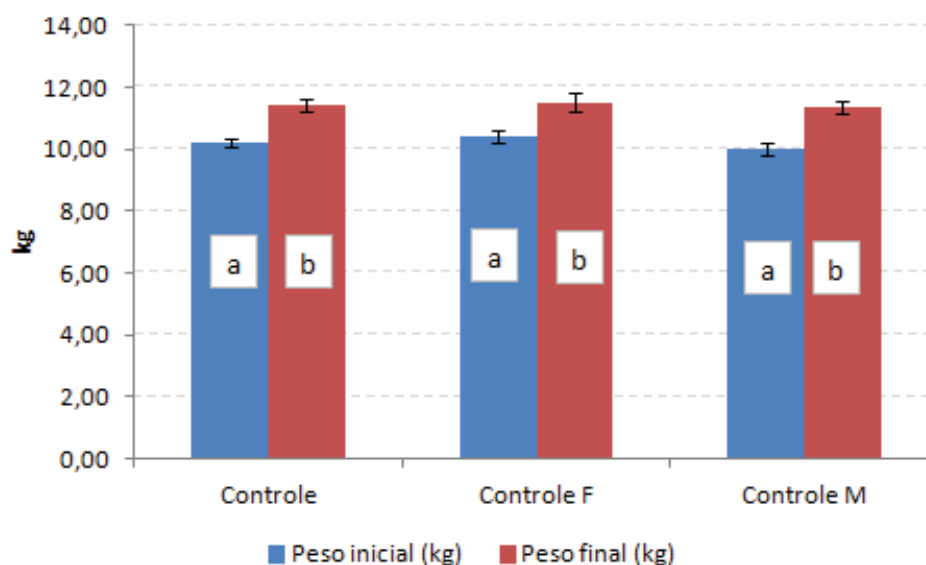
TABELA 16– PESO CORPORAL ANTES E APÓS EXPERIMENTO

	Peso inicial (kg)	Peso final (kg)	CV (%)
Controle	10,20±0,15 ^a	11,42±0,17 ^b	4,15
Controle – fêmeas	10,39±0,20 ^a	11,51±0,30 ^b	4,62
Controle – machos	10,01±0,19 ^a	11,34±0,21 ^b	3,72
Tratamento	10,80±0,44 ^a	12,14±0,56 ^a	11,62
Tratamento – fêmeas	9,90±0,08 ^a	11,36±0,49 ^b	5,68
Controle – machos	11,47±0,57 ^a	12,72±0,84 ^a	11,90

*CV = coeficiente de variação

FONTE: a autora (2018)

GRÁFICO 15 – GRUPO CONTROLE: PESO INICIAL E FINAL

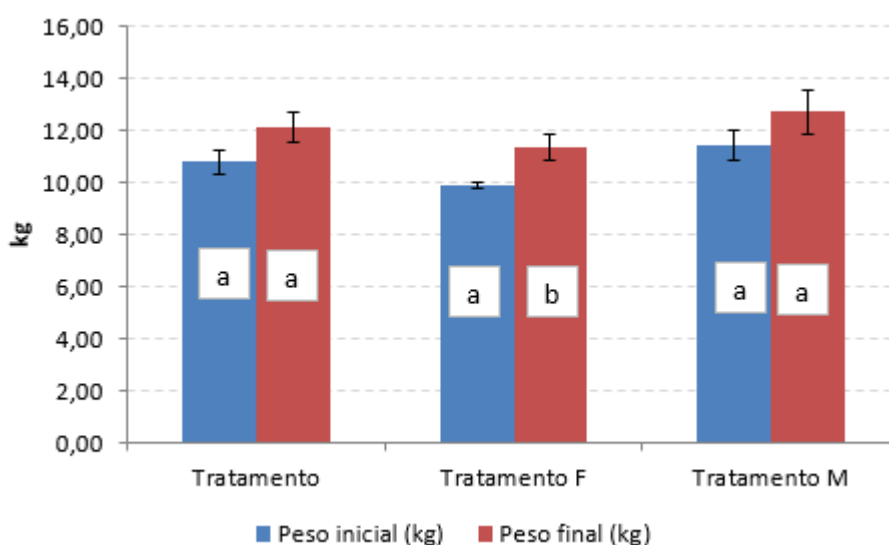


FONTE: a autora (2018)

Os animais do grupo controle apresentaram ganho de peso, constatado tanto nos machos quanto nas fêmeas. O grupo iniciou o experimento com peso médio de 10,20 kg e no final atingiram o peso de 11,42 kg.

O grupo tratamento não apresentou diferença significativa entre os pesos médios no início e final do experimento. Porém, no comparativo por sexo, foi verificado aumento de peso significativo apenas nas fêmeas, que passaram de 9,90 kg para 11,36 kg, conforme GRÁFICO 16.

GRÁFICO 16 – GRUPO TRATAMENTO: PESO INICIAL E FINAL



FONTE: a autora (2018)

4.7.2 Resultados das amostras de sangue

4.7.2.1 Análise do colesterol

As amostras de sangue de todos os animais apresentaram valores dentro dos índices de normalidade. Os valores de colesterol dos animais alimentados com ração suplementada (grupo tratamento) apresentaram redução média de 20% quando comparado no tempo inicial (0 dias, antes do experimento) e final (após 30 dias recebendo a dieta tratamento), ou seja, os níveis de colesterol caíram de 153 mg/dL para 121,4 mg/dL. O grupo controle (cães alimentados com ração não suplementada) não apresentou redução significativa do colesterol após 30 dias de experimento. A TABELA 17 apresenta um resumo dos resultados obtidos, sendo que as médias

situadas na mesma linha, com índice de letras iguais, não apresentam diferença significativa (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

TABELA 17– COLESTEROL ANTES E APÓS EXPERIMENTO

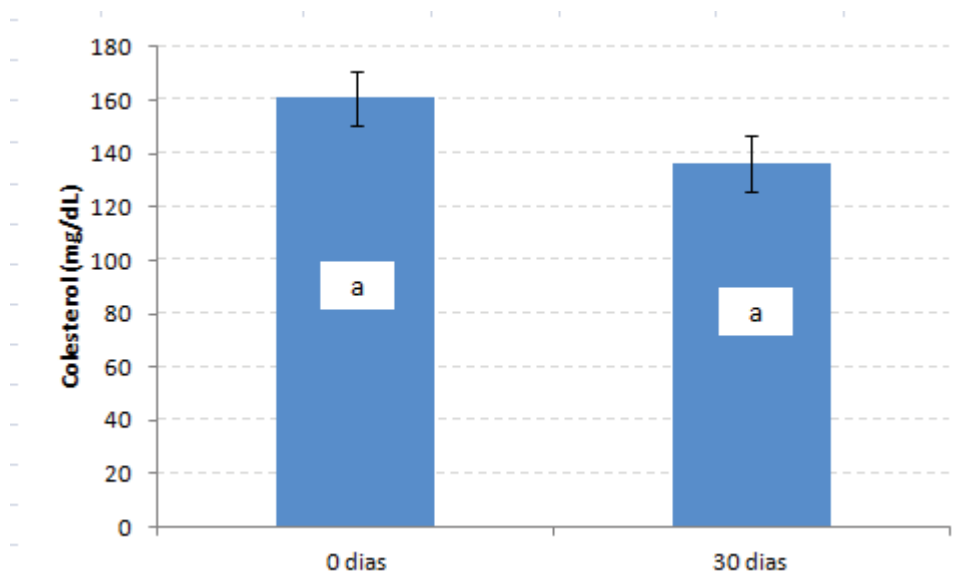
Colesterol (mg/dL)	0 (dias)	30(dias)	CV (%)
Controle (ração sem biomassa)	160,7±9,81 ^a	136,3±10,35 ^a	17,96
Tratamento (5% de biomassa)	153,0±8,08 ^a	121,4±10,21 ^b	18,99

*CV = coeficiente de variação

FONTE: a autora (2018)

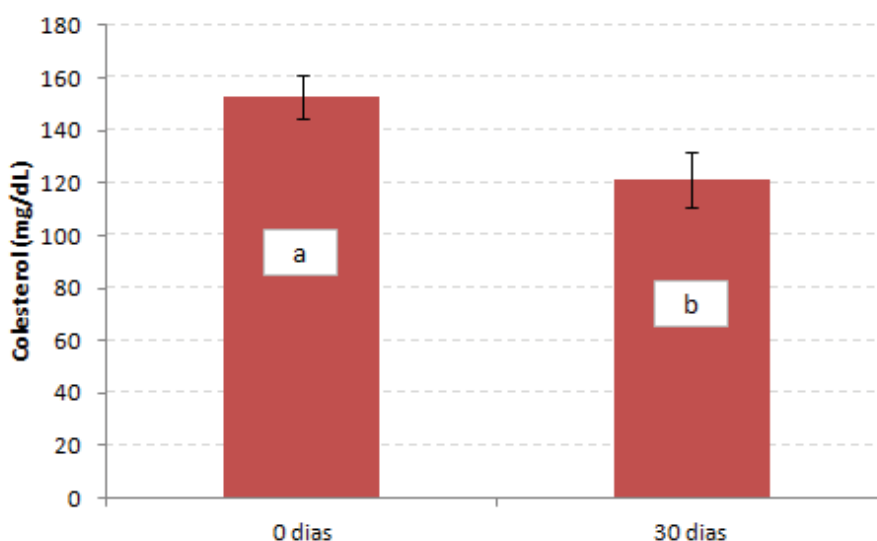
Os GRÁFICOS 17 e 18 mostram os valores de colesterol obtidos na TABELA 17. As colunas com letras iguais não apresentam diferenças significativas entre as médias.

GRÁFICO 17 – GRUPO CONTROLE: INÍCIO E FIM DO EXPERIMENTO



FONTE: a autora (2018)

GRÁFICO 18 – GRUPO TRATAMENTO: INÍCIO E FIM DO EXPERIMENTO



FONTE: a autora (2018)

Apesar dos coeficientes de variação (CV) obtidos nesta análise terem sido altos, na faixa entre 15 a 20%, podemos considerar a dispersão dos dados como média e a precisão especificada como boa (Ferreira, 1991). Portanto, devido à redução de colesterol constatada para o grupo tratamento, o mesmo teve seus resultados analisados separadamente por sexo. A TABELA 18 apresenta os valores obtidos e o GRÁFICO 19 permite visualizar a redução alcançada apenas pelos cães machos, uma vez que as fêmeas não apresentaram diferença significativa entre as médias no início e final do experimento.

As médias situadas na mesma linha, com índice de letras iguais, não apresentam diferença significativa (teste Tukey, $p \leq 0,05$).

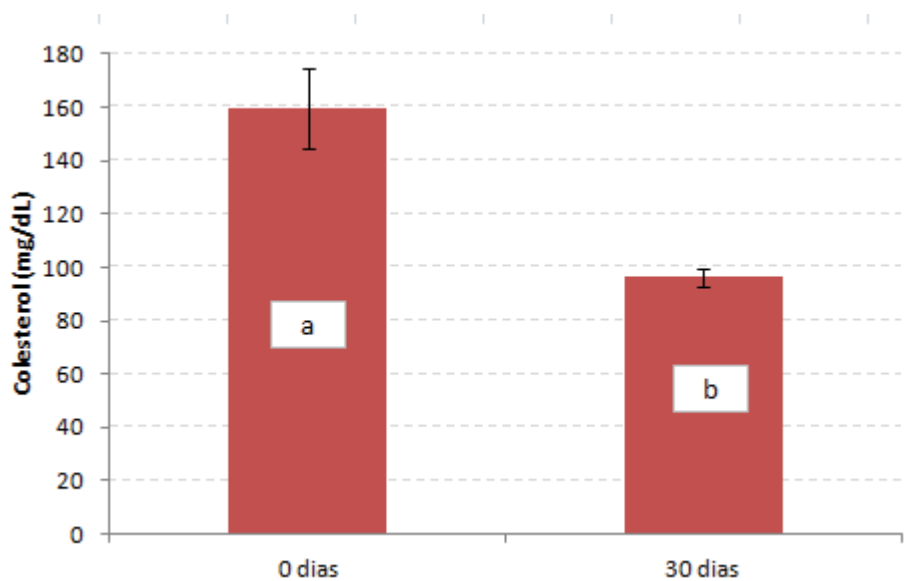
TABELA 18– COLESTEROL GRUPO TRATAMENTO: FÊMEAS x MACHOS

Colesterol (mg/dL)	0 (dias)	30 (dias)	CV (%)
Tratamento– fêmeas	146,5±6,76 ^a	146,5±7,45 ^a	9,71
Tratamento – machos	159,5±15,20 ^a	96,3±3,22 ^b	17,18

*CV = coeficiente de variação

FONTE: a autora (2018)

GRÁFICO 19 – GRUPO TRATAMENTO: CÃES MACHOS



FONTE: a autora (2018)

4.7.2.2 Análise dos triglicérides

Das análises para obtenção dos triglicérides foram constatados valores com redução significativa, porém os percentuais de redução foram semelhantes tanto para o grupo controle quanto para o grupo tratamento. A TABELA 19 exhibe os valores obtidos, sendo que as médias situadas na mesma linha, com índice de letras iguais, não apresentam diferença significativa (teste Tukey, $p \leq 0,05$). Os GRÁFICOS 20 e 21 mostram os valores médios obtidos para os dois grupos.

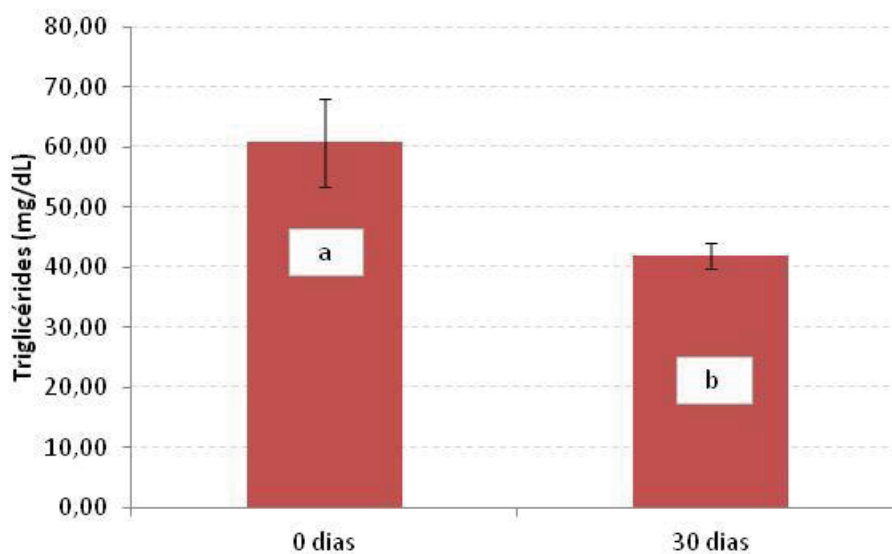
TABELA 19– TRIGLICÉRIDES: TRATAMENTO x CONTROLE

Triglicérides (mg/dL)	0 (dias)	30 (dias)	CV (%)
Tratamento	60,8±7,26 ^a	42,0±2,21 ^b	20,47
Controle	63,3±4,91 ^a	41,6±2,98 ^b	18,37

*CV = coeficiente de variação

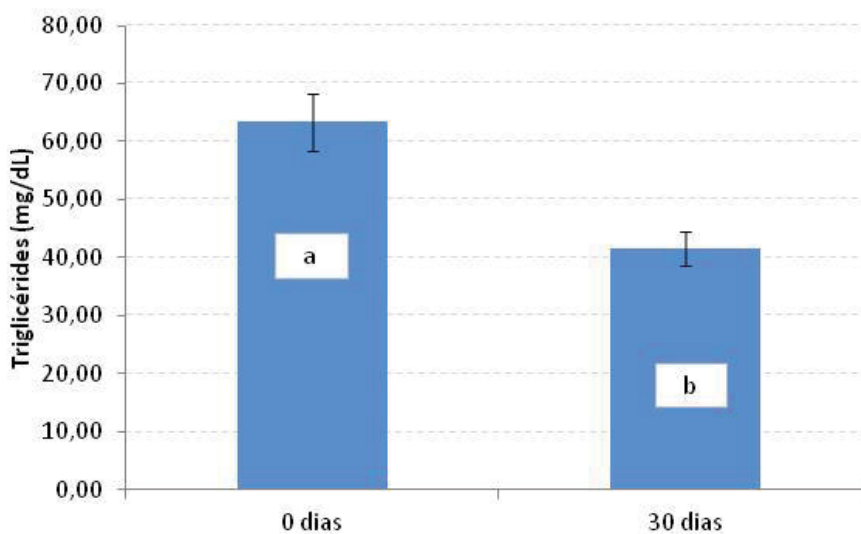
FONTE: a autora (2018)

GRÁFICO 20 – TRIGLICÉRIDES: GRUPO TRATAMENTO



FONTE: a autora (2018).

GRÁFICO 21 – TRIGLICÉRIDES: GRUPO CONTROLE



FONTE: a autora (2018)

O grupo tratamento apresentou redução de 31% nos triglicérides após 30 dias de experimento, ficando com valor de 41,6 mg/dL, porém o grupo controle atingiu 42,0 mg/dL resultando em efeito semelhante entre as dietas para esta análise.

4.7.2.3 Análise do ALT/TGP (alanina aminotransferase)

O ensaio ALT/TGP ajuda a identificar lesões e doenças do fígado devido à presença elevada da enzima alanina aminotransferase no sangue, a qual está presente dentro das células do fígado e quando existe uma lesão ou toxinas a mesma é liberada, (IFCC, 2002). A TABELA 20 mostra que não houve alteração significativa nos valores de ALT após 30 dias de alimentação com a ração suplementada (5% de biomassa).

TABELA 20– ALT/TGP: GRUPO TRATAMENTO

ALT/TGP (U/L)	0 (dias)	30 (dias)	CV (%)
Tratamento	39,1±1,83 ^a	35,1±2,63 ^a	18,76

*CV = coeficiente de variação

FONTE: a autora (2018)

4.8 ANÁLISE TERMOECONÔMICA

Os resultados da análise exergética para a planta de produção de ração foram calculados considerando as seguintes condições:

- Planta simples com capacidade máxima de produção 5 ton/h;
- Condição ideal de funcionamento dos equipamentos (sem considerar *start-up* de linha ou redução devido a desgastes);
- Valores de dólar e energia com base em junho/2017.

A TABELA 21 apresenta os fluxos de exergia para cada equipamento, que é considerado um volume de controle, conforme teoria de Bejan et al. (1996), bem como os custos de exergéticos por equipamento, apenas com base na exergia destruída. No equipamento 13 foi incluída a entrada da biomassa seca de microalga, na dosagem de 5% conforme realizado no experimento, e para o cálculo da exergia referente a este fluxo adicional foi utilizada a energia bruta mensurada em laboratório por meio de bomba calorimétrica (item 3.1.10). Portanto, neste estudo não foram considerados os custos de produção da biomassa, bem como o tratamento térmico realizado para combater os microrganismos.

TABELA 21– CUSTOS EXERGÉTICOS POR EQUIPAMENTO

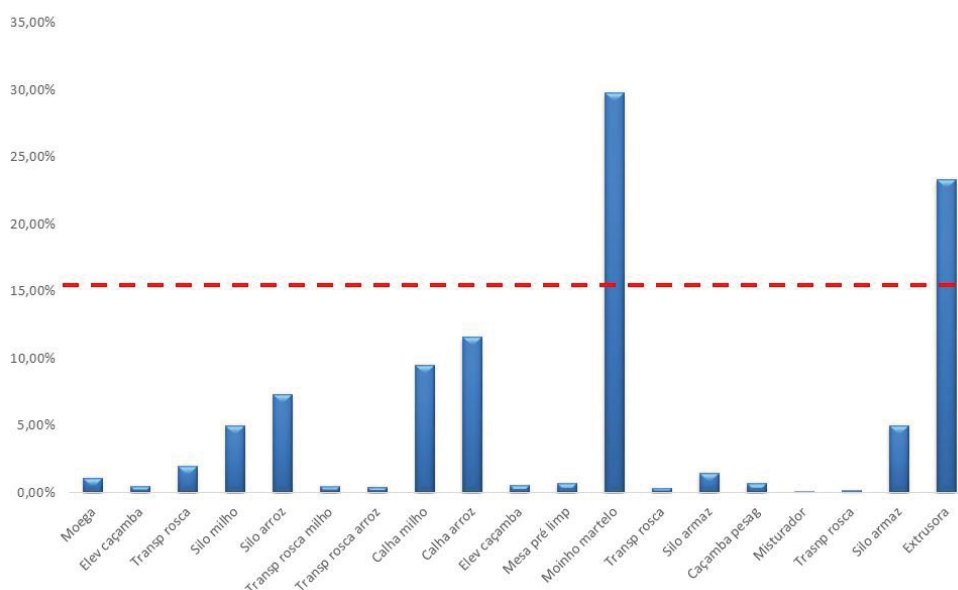
Equip	Descrição	Exerg Destruida kJ/h	\$ / h	h / ano	%
1	Moega	24.468,91	\$	1,50	\$ 3.732,32 1,10%
2	Elev caçamba	10.685,00	\$	0,65	\$ 1.629,82 0,48%
3	Transp rosca	43.298,13	\$	2,65	\$ 6.604,41 1,95%
4a)	Silo milho	110.201,94	\$	6,73	\$ 16.809,47 4,97%
4b)	Silo arroz	162.671,85	\$	9,94	\$ 24.812,88 7,34%
5a)	Transp rosca milho	9.975,69	\$	0,61	\$ 1.521,63 0,45%
5b)	Transp rosca arroz	9.501,46	\$	0,58	\$ 1.449,29 0,43%
6a)	Calha milho	210.486,33	\$	12,86	\$ 32.106,18 9,50%
6b)	Calha arroz	257.319,32	\$	15,73	\$ 39.249,77 11,61%
7	Elev caçamba	12.386,91	\$	0,76	\$ 1.889,42 0,56%
8	Mesa pré limp	15.689,97	\$	0,96	\$ 2.393,24 0,71%
9	Moinho martelo	660.024,49	\$	40,33	\$ 100.675,74 29,79%
10	Transp rosca	7.615,58	\$	0,47	\$ 1.161,63 0,34%
11	Silo armaz	32.595,69	\$	1,99	\$ 4.971,93 1,47%
12	Caçamba pesag	15.162,99	\$	0,93	\$ 2.312,86 0,68%
13	Misturador	1.694,90	\$	0,10	\$ 258,53 0,08%
14	Trasnp rosca	3.912,67	\$	0,24	\$ 596,81 0,18%
15	Silo armaz	110.963,04	\$	6,78	\$ 16.925,56 5,01%
16	Extrusora	517.123,22	\$	31,60	\$ 78.878,53 23,34%
Total de custo exergético por ano			\$	135,41	\$ 337.980,02 100,00%

Fonte: a autora (2017)

O moinho martelo e a extrusora apresentaram maior custo exergético (kJ/h) com relação aos outros equipamentos do processo de produção da ração. A inclusão da biomassa no misturador contribuiu com apenas 2% da exergia destruída referente ao equipamento, ou seja, pouco menos que US\$ 5/ano.

O GRÁFICO 22 aponta o percentual de participação nos custos exergéticos para cada equipamento. A linha tracejada aponta o limite de perda exergética que foi estabelecido conforme Bejan et al. (1996), o qual informa que em média, para uma planta com todos os equipamentos em funcionamento, a eficiência global de 85% é considerada satisfatória BEJAN (1996, p. 370). Desta forma, os dados permitem verificar que o moinho martelo e a extrusora são os pontos críticos do processo, os quais devem receber atenção para melhoria do desempenho.

GRÁFICO 22 – PARTICIPAÇÃO DOS EQUIPAMENTOS NO CUSTO EXERGÉTICO

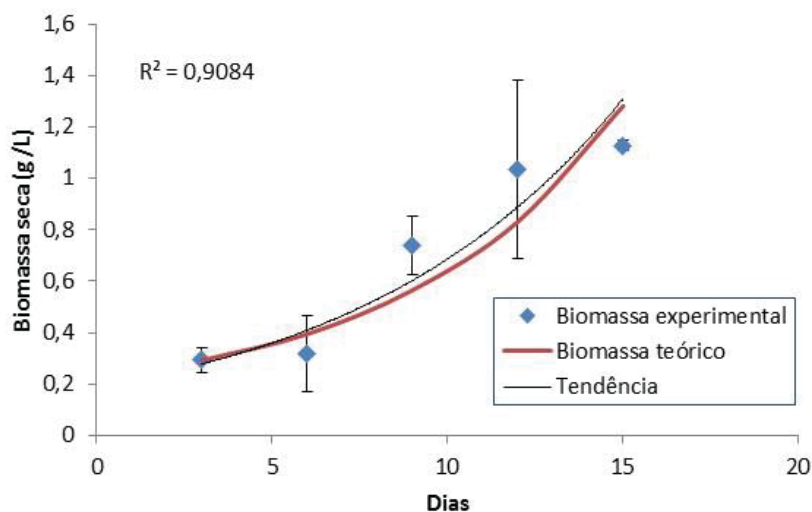


Fonte: a autora (2017)

4.9 RESULTADOS DA MODELAGEM

Os dados experimentais foram utilizados na validação do modelo matemático, bem como para definir os valores iniciais da simulação, o modelo foi então ajustado para a melhor condição de representatividade das variáveis de interesse biomassa seca, lipídeos, carboidratos e proteínas. Os resultados da modelagem representaram de maneira satisfatória os dados experimentais. Sendo assim, o GRÁFICO 23 apresenta a curva experimental do aumento da concentração de biomassa durante o período total de 15 dias, com pontos de coleta a cada 3 dias, incluindo a curva teórica do modelo. Uma linha de tendência foi traçada com base nos dados experimentais, porém com comportamento próximo à curva da modelagem obtendo-se o grau de confiabilidade $R^2 = 0,9084$, portanto pode ser utilizado como uma referência quanto à capacidade preditiva do modelo.

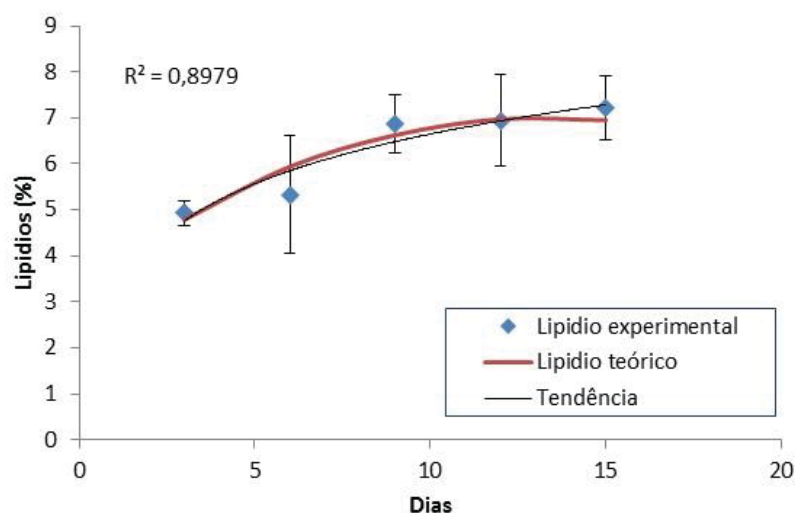
GRÁFICO 23 – RESULTADO DA MODELAGEM DA BIOMASSA SECA



Fonte: Lírio et al. (2018)

O GRÁFICO 24 apresenta a curva experimental do aumento da porcentagem de lipídeos identificada nas amostras coletadas, bem como a curva teórica do modelo matemático. A linha de tendência traçada com base nos dados experimentais apresentou grau de confiabilidade $R^2 = 0,8979$, podendo ser utilizado como referência à capacidade preditiva do modelo.

GRÁFICO 24 – RESULTADO: MODELAGEM DA PORCENTAGEM DE LIPÍDEOS

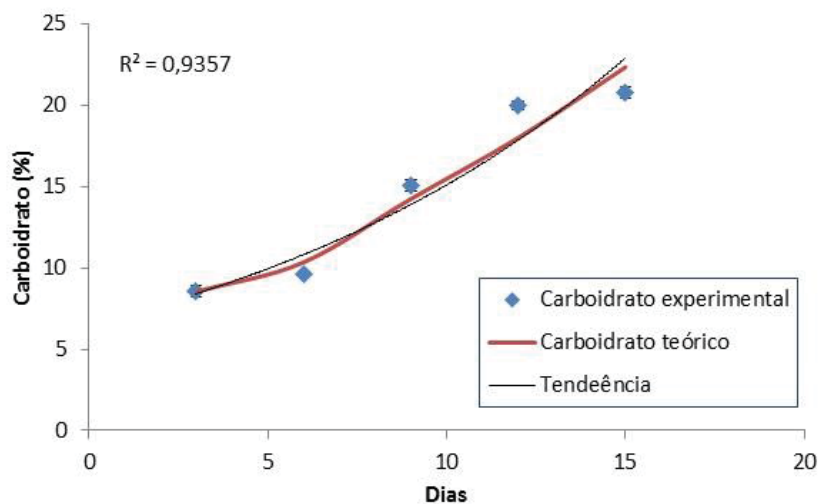


Fonte: Lírio et al. (2018)

O GRÁFICO 25 mostra o aumento da porcentagem de carboidrato identificada nas amostras coletadas, onde a curva teórica do modelo matemático apresenta capacidade preditiva satisfatória com relação aos dados experimentais. A linha de

tendência traçada apresentou grau de confiabilidade $R^2 = 0,9357$, podendo ser utilizado como referência para a representatividade do modelo.

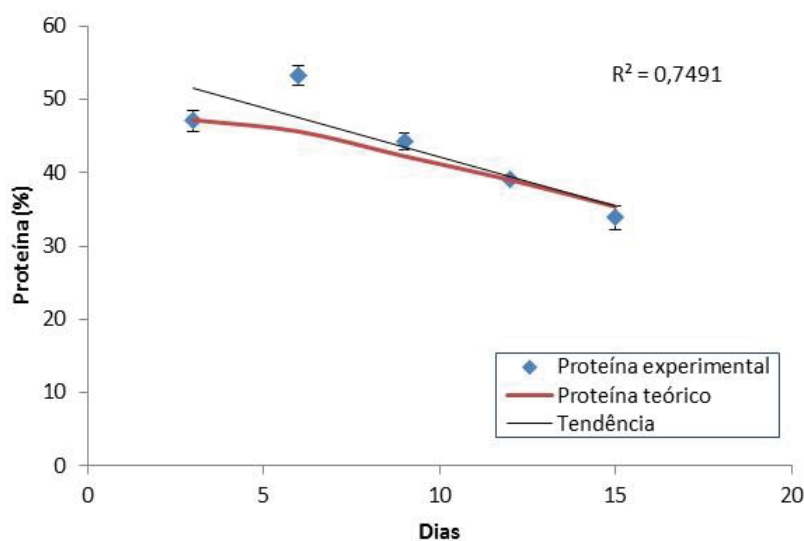
GRÁFICO 25 – RESULTADO: MODELAGEM DA PORCENTAGEM DE CARBOIDRATO



Fonte: Lírio et al. (2018)

Finalmente, a porcentagem de proteína contida nas amostras coletadas foi representada pelo modelo conforme mostra o GRÁFICO 26. A linha de tendência que melhor se aproxima do comportamento do resultado teórico é a linear com confiabilidade de $R^2 = 0,7491$, portanto indicando que o modelo representou satisfatória capacidade preditiva.

GRÁFICO 26 – RESULTADO: MODELAGEM DA PORCENTAGEM DE PROTEÍNA



Fonte: Lírio et al. (2018)

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Nesta pesquisa foi analisado o uso da biomassa da microalga *Tetrademus obliquus* como fonte alternativa na suplementação das rações caninas comerciais, verificada a viabilização da inclusão deste produto num modelo de processo produtivo industrial de ração, além de ter sido elaborado um modelo matemático referente a obtenção dos parâmetros de interesse nutricional. Os resultados obtidos mostram que o uso da biomassa da microalga *Tetrademus obliquus* pode trazer benefícios para a saúde dos cães, sendo uma fonte natural, de origem sustentável, composta por elementos nutricionais tais como proteínas, lipídeos, fibras, elemento do grupo ômega 3 (ácido alfa linolênico) e cargas minerais. Sendo assim, espera-se que este seja um passo inicial para a exploração da biomassa da microalga *Tetrademus obliquus* como fonte nutricional na alimentação de cães, podendo ser destinada para formulações voltadas a populações específicas, tais como cardíacos ou obesos.

As principais conclusões deste estudo são sumarizadas a seguir a partir dos objetivos específicos pré-estabelecidos:

1. A análise das propriedades da biomassa da microalga *Tetrademus obliquus* foi realizada e detectou a presença de elementos interessantes para fins nutricionais, tais como: alto percentual de proteínas (35,98%), fibras (3,50%), extrato etéreo (11,6%), carga mineral, altos valores de energia bruta (5,47 kJ kg⁻¹), além da presença do ácido alfa linolênico (ALA) pertencente ao grupo ômega 3;
2. A análise microbiológica foi realizada e os microorganismos prejudiciais a saúde animal foram reduzidos aos níveis especificados, com objetivo de garantir a segurança alimentar exigida na legislação vigente do MAPA;
3. A ração comercial suplementada com biomassa foi analisada em comparação com a mesma ração sem adição e os resultados obtidos mostraram teor de fibras cerca de 40% maior (2,64% sobre matéria seca), bem como concentração 7% maior de resíduo mineral (7,57% sobre matéria seca) e 16% a mais da concentração de cálcio (2,09% sobre matéria seca), porém com concentração 6% menor, valor de 44,33% sobre matéria seca, de extrativos não nitrogenados (carboidratos de fácil digestão, como por exemplo açúcares, amidos, etc). Os cálculos da digestibilidade mostraram que a ração suplementada apresentou maior valor da energia metabolizável

(valor médio de 3,56 kcal g⁻¹) podendo significar bom aproveitamento dos ingredientes ingeridos, (Carciofi, 2008);

4. A análise termoeconômica, com base num modelo de planta industrial de ração para cães foi desenvolvida e teve como principal função mensurar os custos aproximados referente a adição da biomassa na mistura da ração, mostrando um impacto de apenas 2% da exergia destruída, ou seja, pouco menos que US\$ 5/ano;
5. Um modelo matemático em regime transiente, com base no balanço de massa intra e extracelular, foi elaborado visando quantificar, em escala laboratorial (com condições controladas e uso do meio de cultivo sintético), a geração das concentrações de biomassa, lipídeos, proteínas e carboidratos, obtidas a partir do cultivo da microalga *Tetrademus obliquus*;
6. O meio de cultivo foi realizado utilizando 15 erleymeyers, contendo o meio CHU modificado (Santos, 2016) num volume de 1,6 L/cada, a temperatura, luminosidade e vazão do ar foram mantidas constantes, sendo 22 ± 2 °C, 720 a 760 Lux e aproximadamente 1,5 L min⁻¹. O meio foi inoculado com 200 cel mL⁻¹;
7. Os dados experimentais foram obtidos a partir das análises das amostras coletadas do meio de cultivo, a cada 3 dias, durante um período de 15 dias de acompanhamento;
8. Os resultados do modelo matemático para quantificação da geração da biomassa, proteínas, lipídeos e carboidratos, foram comparados com os dados experimentais e apresentaram grau de confiabilidade acima de 0,80, indicando capacidade preditiva satisfatória (modelo validado), podendo ser considerado como uma ferramenta auxiliar no gerenciamento do processo de cultivo, desde que dentro de condições limites semelhantes;
9. Os cães foram pesados no início e final do experimento (duração de 32 dias), após o período de 25 dias de adaptação com fornecimento das rações tratamento e controle, as amostras biológicas (sangue e fezes) foram coletadas durante 5 dias quando os animais permaneceram fechados nas baias e nos últimos 2 dias do experimento foi realizado o ensaio de palatabilidade (preferência alimentar);
10. As amostras biológicas coletadas foram analisadas, de forma comparativa, no caso das fezes com relação as propriedades químicas e as amostras de

sangue quanto ao colesterol, triglicérides e a análise de toxicidade baseada no ensaio ALT/TGP (alanina aminotransferase). O comparativo das fezes mostrou maior presença de fibras FDA no grupo tratamento (12,79% sobre matéria seca), o que pode ter contribuído para a melhor formação do bolo fecal, no entanto a presença do maior percentual de proteínas (23,91% sobre matéria seca) para as fezes do grupo tratamento pode indicar dificuldade de absorção da proteína de fonte vegetal, por isto a necessidade de complementar a dieta com proteína animal. O comparativo das amostras sanguíneas mostrou redução de aproximadamente 20% do colesterol no sangue dos cães machos pertencentes ao grupo tratamento, ou seja, redução de 153 mg/dL para 121,4 mg/dL. O peso corporal foi mantido para o grupo tratamento, podendo indicar um fator positivo nos casos de obesidade; não houve indício de toxicidade e a ração suplementada apresentou maior índice de preferência alimentar com valor de 50,5% da maior fração ingerida;

11. Os resultados obtidos mostram que, assim como foi feito na pesquisa, a biomassa de microalga pode ser adicionada a uma ração comercial relativamente barata e tornar a formulação enriquecida com elementos de valor de nutricional, aproximando para uma dieta suplementada.

5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Apresentam-se as seguintes sugestões para continuidade deste trabalho:

1. Os resultados obtidos apontam a necessidade de repetir os ensaios com maior número de cães para confirmação dos dados;
2. Desenvolver estudos conduzidos com grupos de cães obesos ou com disfunção cardíaca para verificação de possíveis benefícios;
3. Realizar a extração do óleo da biomassa da microalga *Tetrademus obliquus* para adicionar no processo de produção da ração e verificar os resultados comparativos, uma vez que pode facilitar a digestibilidade e absorção de nutrientes pelo organismo dos cães.

REFERÊNCIAS

- ABINPET, Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação. Disponível em: <http://abinpet.org.br/site/mercado/>. Acesso em 19 set.2017.
- ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS - AAFCO. **Dog and cat nutrient profiles**. Official Publication of the Association of American Feed Control Officials Incorporated. Oxford: AAFCO, 276p., 2004
- ALLTECH, Alltech do Brasil S.A. Disponível em: <http://pt.alltech.com/animal-nutrition/pet/health>. Acesso em 19 set. 2017.
- ALTA, D.Z.; ERTEKIN, C. A review on exergy analysis of food production processes. **Proceedings International Conference of Agricultural Engineering (AngEng)**, Zurich, 1-8, 2014.
- ARAUJO, M.M.G. et al. Avaliação de colesterol e triglicerídeos séricos em cães saudáveis suplementados com ômega n-3. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.64, n.6, 1491-1496, 2012.
- ALVES, A.A.; FILHO, M.C.M.; SILVA, D.C.; AZEVEDO, D.M.M.R. Avaliação de alimentos para ruminantes no Nordeste do Brasil, **Embrapa Meio-Norte**, 16 p., 2008.
- BALEN, R. E.; JUNIOR, E.G.; MARQUES, A.E.M.L.; CESTARI, M.M.; VARGAS, J.V.C.; CORRÊA, D.O.; MARIANO, A.B.; MEURER, F. Effect of defatted microalgae (*Scenedesmus obliquus*) biomass inclusion on growth performance of *Rhamdia quelen*. **Journal of Applied Ichthyology**, 31, suppl.4, 98-101, 2015.
- BARROS, K.S.B. **Produção da biomassa de *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*) para alimentação humana**. 2010. 110 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Paraíba, Ciência e Tecnologia de Alimentos, João Pessoa, 2010.
- BAUER, J.J.E. Essential fatty acid metabolism in dogs and cats. **Rev. Bras. Zootecnia**, v. 37, 20 – 27, 2008.
- BEJAN, A.; TSATSARONIS, G.; MORAN, M. **Thermal design and optimization**. USA: A Wiley-Interscience Publication, 1996.
- BLIGHT, E.G.; DYER, W.J. A rapid method for total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.**, v.37, 911-917, 1959.
- BOYAR, S.; AKDENIZ, R.C.; HEPBASLI, A. Performance evaluation of na extruder system in a mixed feed factory. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v.10 (3&4), 524-527, 2012.
- BLASKOVIC, M. et al. The effect of a spot-on formulation containing polyunsaturated fatty acids and essential oils on dogs with atopic dermatitis. **The Veterinary Journal**, 199, 39-43, 2014.

BLOG BIOENERGIA A PARTIR DE MICROALGAS. Disponível em: <http://bioenergiamicroalgas.blogspot.com.br/2013/07/>. Acesso em: 03 set. 2017.

BRASIL. Instrução Normativa nº 4, de 23 de fevereiro de 2007. Regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos fabricantes de produtos destinados à alimentação animal e o roteiro de inspeção. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)**, 2007.

BRASIL. Normas e padrões de nutrição e alimentação animal. 152 f. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)**, 2000.

CARVALHO, V.G. **Desenvolvimento de um sistema para a dosagem de micronutrientes para ração animal**. 2013. 53 f. Universidade de Brasília, Engenharia Mecânica, Brasília, 2013.

CARCIOFI, A.C. et al. Qualidade e digestibilidade de alimentos comerciais de diferentes segmentos de mercado para cães adultos. **Rev. Bras. Saúde e Prod. An.**, v. 10, n. 2, 489-500, 2009.

CBAA – **Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal**. Guia de métodos analíticos, 2009.

CASE, L. P., CAREY, E. P., HIRAKAWA, D. A. **Canine and feline nutrition**. A resource for companion animal professionals. St. Louis: Mosby, 455p, 1995.

DESCHÊNES, J.S.; WOUWER, A.V. Dynamic optimization of biomass in continuous cultures of microalgae *Isochrysis galbana* through modulation of the light intensity. **IFAC – PapersOnLine**, 48-8, 1093-1099, 2015.

DESCHÊNES, J.S.; WOUWER, A.V. Parameter identification of a dynamic model of cultures of microalgae *Scenedesmus obliquus* – An experimental study. **IFAC – PapersOnLine**, 49-7, 1050-1055, 2016.

DOMINGUES, M.A.J. **Determinação de sódio em biscoitos comercializados na região de Assis**. 2012. 48 f. Fundação Educacional do Município de Assis (FEMA), Assis, 2012.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, 350-356, 1956.

ELKIN, R.G. et al. Influence of feeding stearidonic acid (18:4n-3) – enriched soybean oil, as compared to conventional soybean oil, on tissue deposition of very long-chain omega – 3 fatty acids in meat type chickens. **Animal Feed Science and Technology**, Pennsylvania State, USA, 217, 1-12, 2016.

FÉLIX, A.P. **Avaliação de aditivos sobre as características das fezes de cães**. 2009. 71 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Ciências Veterinárias, setor de Ciências Agrárias, Curitiba, 2009.

FÉLIX, A.P. **Avaliação nutricional de derivados proteicos de soja para cães**. 2011. 188 f. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Paraná, Ciências Veterinárias, Curitiba, 2011.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **Journal Biol. Chem.**, 497-509, 1956.

GRIFFIN, R. W. Palatability testing: Parameters and analyses that influence test conclusions. In: KVAMME, J.L.; PHILLIPS, T.D. **Pet food technology**. Illinois Mt Morris, 187-193, 2003.

HADLEY, K.B. et al. The oil-rich alga *Schizochytrium sp.* as a dietary source of docosahexaenoic acid improves shape discrimination learning associated with visual processing in a canine modelo of senescence. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)**, 118, 10-18, 2017.

HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Centro de Tecnologia Agrícola e Alimentar**, Rio de Janeiro, 1973.

HE, Q. et al. Effect of light intensity on physiological changes, carbon allocation and neutral lipid accumulation in oleaginous microalgae. **Bioresource Technology**, 191, 219-228, 2015.

IAL – Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**, São Paulo, 2008.

IFCC Reference Procedure for the Measurement of Catalytic Concentration of Alanine Aminotransferase. **Clin Chem Lab Med**, 40 (7), 718-24, 2002.

KIM, J.H.; SIMON, T.W. Journal of heat transfer policy on reporting uncertainties in experimental measurements and results. **Journal of Heat Transfer Editorial**, v. 115/5, 1993.

LEMAHIEU, C.; BRUNEEL, C.; VERHALLE, R.T.; MUYHAERT, K.; BUYSE, J.; FOUBERT, I. Impact of feed supplementation with different omega-3 rich microalgae species on enrichment of eggs of laying hens. **Food Chemistry**, 141, 4051 – 4059, 2013.

MAIRET, F. et al. Modelling lipid production in microalgae. **International Symposium on Dynamics and Control of Process Systems**, Leuven, Belgium, 493-498, 2010.

MAIRET, F. et al. Modelling microalgae growth in nitrogen limited photobioreactor for estimating biomass, carbohydrate and neutral lipid productivities. **The International Federation of Automatic Control**, Milano, Italy, 10591-10596, 2011.

MCCUSKER, S. et al. Amino acid content of selected plant, algal and insect species: a search for alternative protein sources for use in pet foods. **Journal of Nutrition Science**, vol. 3, e39, 1-5, 2014.

MEHLER, S.J. et al. A prospective, randomized, Double blind, placebo-controlled evaluation of the effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on the clinical signs and erythrocyte membrane polyunsaturated fatty acid concentrations in dogs with osteoarthritis. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)**, 109, 1-7, 2016.

NETO, J.M.C. et al. Farinha de algas marinhas (*Lithothamnium calcareum*) como suplemento mineral na cicatrização óssea de autoenxerto cortical em cães. **Revista Bras. Saúde Prod. An.**, v.11, n.1, 217-230, 2010.

NPDEAS, Energia Sustentável. Disponível em: <http://npdeas.blogspot.com.br>. Acesso em 19 set. 2017.

NREL – National Renewable Energy Laboratory. **Summative mass analysis of algal biomass – Integration of analytical procedures**. Laboratory Analytical Procedure (LAP), revised december 2015.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of dogs and cats**. Washington, D.C: National Academy Press, 2006

OLIVEIRA, C.F.P.M. **Aplicação do Colilert à enumeração de *Escherichia coli* em alimentos**. 2013. 129 f. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche Instituto Politécnico de Leiria, 2013.

OLIVEIRA, I.N.V. et al. Perfil hematológico e bioquímico de cães infectados por *Dirofilaria immitis* da localidade da ilha de Algodoal, Pará. **Revista Bras. Med. Veterinária**, 35 (supl. 2), 74-80, 2013.

PARK, H.J. et al. Dietary fish oil and flaxseed oil suppress inflammation and immunity in cats. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 141, 301-306, 2011.

PERRIN, L.; LUCAS, F.; PUTIER, F. Manual de eficiência energética em indústrias de rações para animais. **Transferring Energy Save Laid on Agroindustry (TESLA)**, 2014.

POLI et al. Uma avaliação das metodologias para determinação do poder calorífico dos resíduos sólidos urbanos. **Revista de Ciências Exatas e Tecnologia**, v. 8, n. 8, 9-31, 2013.

PROSKY, L. et al. Determination of total dietary fiber in foods and food products: Collaborative study. **Journal AOAC**, 68, 677-679, 1992.

RINSUM et al. Subcellular localization and tissue distribution of sialic acid-forming enzymes. **Biochem. J.**, 223, 323-328, 1984.

SANTOS, B. **Estratégia para aumentar a produtividade de biomassa com carbono orgânico**. 2016. 103 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Engenharia e Ciências de Materiais, setor de Tecnologia, Curitiba, 2016.

SAEID, A.; CHOJNACKA, K.; KORCZYNSKI, M.; KORNIEWICZ, D.; DOBRZANSKI, Z. Biomass of *Spirulina máxima* enriched by biosorption process as a new feed supplement for swine. **Journal Apply Phycol**, 25, 667 – 675, 2013.

SCALABRIN, L.A. **Dimensionamento de silos metálicos para armazenagem de grãos**. 2008. 158 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do R.G.S., Engenharia Civil, Porto Alegre, 2008.

SESCOOP/PR. Informe agroeconômico. **Estimativa dos custos de recepção, limpeza e secagem da soja e do milho** – Safra 2012/2013, 1-12, 2012.

SILVA, J.S. **Secagem e armazenagem de produtos agrícolas**. Viçosa (MG), Ed. Aprenda Fácil, 2008.

TAHER, D.M. **Biodiesel de microalgas cultivadas em dejetos suíno biodigerido**. 2013. 106 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Engenharia e Ciências de Materiais, setor de Tecnologia, Curitiba, 2013.

TIBBETTS, S.M. et al. Biochemical characterization of microalgal biomass from freshwater species isolated in Alberta, Canada for animal feed applications. **Algal Research**, 11, 435–447, 2015.

VARGAS, J.V.C. **Modelagem e simulação de processo de geração de hidrogênio via cultivo de microalgas em fotobiorreatores compactos**. 2013. Monografia - Universidade Federal do Paraná, Ciências Biológicas, Curitiba, 2013.

VIZCAÏNO, A.J. et al. Effects of the microalga *Scenedesmus almeriensis* as fishmeal alternative in diets for gilthead sea bream, *Sparus aurata*, juveniles. **Aquaculture** (431), 34 – 43, 2014.

ZANATTA, C.P. et al. Metodologias para determinação da digestibilidade de dietas contendo fontes proteicas vegetal ou animal em cães. **Ciência Rural**, v. 43, n. 4, 696-701, 2013.